

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON
U. E. R. Biologie Humaine

Année 1972 - N° 5

DISTRIBUTION DE L'IODE STABLE
ET DE L'IODE TRACEUR
DANS LES COMPOSÉS IODÉS INTRATHYROÏDIENS
DE L'ADÉNOME TOXIQUE

Comparaison avec les résultats obtenus sur les tissus
périnodulaires et sur des glandes humaines normales.

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 28 Avril 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Biologie Humaine

par

Yves BARBIER

né le 27 Mars 1938

à BOURG-EN-BRESSE (Ain)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON
U. E. R. Biologie Humaine

Année 1972 - N°

**DISTRIBUTION DE L'IODE STABLE
ET DE L'IODE TRACEUR
DANS LES COMPOSÉS IODÉS INTRATHYROÏDIENS
DE L'ADÉNOME TOXIQUE**

Comparaison avec les résultats obtenus sur les tissus
périnodulaires et sur des glandes humaines normales.

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 28 Avril 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Biologie Humaine

par

Yves BARBIER

né le 27 Mars 1938

à BOURG-EN-BRESSE (Ain)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

- Président de l'Université : J. BOIDIN
- Premier Vice-Président : R. TOURAINÉ

Secrétaire Général : M. IZAUTE

Unité d'Enseignement et de Recherche de l'Université Médecine

Grange Blanche - Directeur : Professeur D. GERMAIN
Alexis Carrel - Directeur : Professeur C. GIROD
Sud-Ouest - Directeur : Professeur F. TOLOT
Lyon Nord - Directeur : Professeur A. BERTOYE

Biologie humaine - Directeur : Docteur R. CZYBA (Maître de Conférences
Agrégé)

Techniques de Réadaptation - Directeur : Professeur P. MOUNIER-KUHN

Sciences pharmaceutiques - Directeur : M. CARRAZ (Maître de Conférences
Agrégé)

Sciences odontologiques - Directeur : Docteur R. VINCENT

Institut Régional d'Education Physique et Sportive - Directeur :
Professeur R. GUILLET

Mathématiques - Directeur : Doyen BRACONNIER

Physique - Directeur : Professeur DUPAY

Chimie et Biochimie - Directeur : Professeur GAUTHERON

Sciences de la nature - Directeur : Professeur L. DAVID

Biodynamique et psychopédagogie - Directeur : Professeur J. CHANEL

Institut Universitaire de Technologie n° 1 - Directeur:Professeur L. FEUVRAIS

Institut Universitaire de Technologie n° 2 - Directeur:Professeur GALLET,
Directeur ENSAM

Observatoire - Directeur : Professeur J.H. BIGAY

Physique nucléaire - Directeur : Professeur A. SARRAZIN

Examineurs de la Thèse :

- *Président : Monsieur le Professeur M. BERGER.*
- *Assesseurs : Monsieur le Professeur R. MALLEIN
Monsieur le Professeur R. MORET
Monsieur le Professeur J.O. PEYRIN*

A la mémoire de mon PERE

A ma mère

*en reconnaissance de tout ce
qu'ils ont fait pour moi.*

A ma FEMME

A NATHALIE, GILLES et MARION

en témoignage de mon amour.

A mes BEAUX-PARENTS

A mon FRERE

A mes BELLES-SOEURS et BEAUX-FRERES

A tous les MIENS

avec toute mon affection.

A tous mes AMIS

A la mémoire de mon PERE

A ma mère

*en reconnaissance de tout ce
qu'ils ont fait pour moi.*

A ma FEMME

A NATHALIE, GILLES et MARION

en témoignage de mon amour.

A mes BEAUX-PARENTS

A mon FRERE

A mes BELLES-SOEURS et BEAUX-FRERES

A tous les MIENS

avec toute mon affection.

A tous mes AMIS

A mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur M. BERGER

Depuis qu'il nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son laboratoire, son enseignement quotidien, sa rigueur scientifique et aussi ses critiques pertinentes nous ont été un guide précieux dans notre activité universitaire et hospitalière.

Son esprit libre de tous préjugés, son honnêteté intellectuelle ont été pour nous un modèle de vie, sa bienveillance souvent un grand réconfort.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A nos juges

Monsieur le Professeur R. MALLEIN

Il a été pour nous, dans les premières années de nos études et dans nos débuts hospitaliers un guide attentif et vigilant. Il nous a aidé à surmonter des moments difficiles et, nombreux parmi ses élèves sont ceux qui, comme nous, se rappellent l'atmosphère qu'il a su créer dans son service de l'Antiquaille et combien elle restera pour nous un merveilleux souvenir.

Nous lui devons beaucoup et nous le prions de bien vouloir croire au dévouement constant et à la respectueuse sympathie que nous avons pour lui.

Monsieur le Professeur R. MORET

Depuis notre arrivée dans son laboratoire, nous n'avons cessé d'admirer l'étendue de ses connaissances. Sa disponibilité constante, son esprit libéral ont su mettre son entourage dans une ambiance propre à l'émulation et au travail efficace. Nous espérons pouvoir encore être longtemps à ses côtés et profiter de ses conseils et de son exemple. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression du profond attachement que nous lui portons.

Monsieur le Professeur J.O. PEYRIN

C'est à lui que nous devons le sujet de cette thèse. Il nous a toujours témoigné la plus cordiale bienveillance et ses qualités d'enseignant, les indications qu'il nous a toujours prodiguées nous ont été d'une grande aide.

Qu'il veuille bien recevoir ici la marque de notre vive gratitude et l'expression de nos remerciements.

Nous nous devons d'exprimer notre gratitude à

Monsieur le Professeur P. GUINET

*pour nous avoir ouvert son service
et permis ainsi d'entreprendre ce
travail. Qu'il veuille bien croire
à l'assurance de nos sentiments
respectueux.*

Monsieur le Docteur MOTTIN

*pour la compréhension et l'amabili-
té avec laquelle il nous a aidé.
Nous l'assurons de notre profonde
reconnaissance.*

Madame le Docteur M. GUILLAUD

*à qui revient l'étude histologique
des tissus. Elle nous a toujours
reçu avec une accueillante simpli-
cité et nous la prions d'accepter
nos remerciements.*

Monsieur le Docteur J. BRIERE

*pour l'aide qu'il nous a apportée
tout au long de ce travail. Qu'il
trouve ici, un gage de notre recon-
naissance et de notre amitié.*

Monsieur A. BIRON

*qui a toujours su répondre avec
bonne humeur aux diverses sollici-
tations que nous avons pu lui fai-
re. C'est grâce à lui qu'a pu être
réalisée la plus grande partie du
traitement statistique des résul-
tats. Qu'il en soit vivement remer-
cié.*

Madame A. CHAMBOSSE

c'est grâce à sa collaboration que ce travail a pu voir le jour. Nous avons apprécié sa gentillesse et une compétence qui nous a été d'un précieux secours. Nous l'en remercions et l'assurons de toute notre reconnaissance.

A tous nos camarades du laboratoire,

qui font que les moments parfois difficiles dans l'élaboration d'un travail sont vite oubliés. Nous les remercions vivement de leur collaboration et leur renouvelons toute notre amitié.

LISTE DES ABREVIATIONS

I ⁻	= iodure
MIT	= monoiodotyrosine
DIT	= diiodotyrosine
IT	= iodotyrosines (MIT + DIT)
T ₃	= triiodothyronine
T ₄	= tétraiodothyronine ou thyroxine
MIHPPA	= acide monoiodohydroxyphénylpyruvique
DIHPPA	= acide diiodohydroxyphénylpyruvique
TG	= thyroglobuline
PP	= polypeptides

I N T R O D U C T I O N

Si les grandes étapes de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes et du métabolisme de l'iode sont connues, les différents mécanismes qui concourent à cette biosynthèse ne sont encore souvent qu'à l'état d'hypothèses.

Classiquement, on peut représenter l'hormonosynthèse thyroïdienne comme suit (2, 4, 6, 8, 9).

L'iode circulant est tout d'abord concentré dans la thyroïde. La cellule thyroïdienne est responsable de cette concentration. Certaines conditions énergétiques et physico-chimiques nécessaires à la concentration de l'iode sont connues et ont été vérifiées *in vitro*, mais il est difficile de les intégrer dans un système cohérent.

Cet iodure va ensuite intervenir dans l'iodation des résidus tyrosine de la thyroglobuline mais il devra être auparavant oxydé sous une forme active grâce à une peroxydase. Des doutes subsistent sur la nature de cette forme oxydée : ion iodinium I^+ , iode atomique I , ions hypoiodite IO^- ou iode moléculaire I_2 . Cette forme oxydée va ioder les résidus tyrosine de la thyroglobuline, aboutissant à des résidus de monoiodotyrosine (MIT) et diiodotyrosine (DIT). Une tyrosine-iodase, dont on n'a pu prouver l'existence, a été impliquée dans cette réaction mais l'activité peroxydasique du tissu est suffisante pour assurer cette iodation. La quatrième phase importante de la biosynthèse hormonale thyroïdienne est la réaction de couplage des iodotyrosines aboutissant à la formation de la tétraiodothyronine ou thyroxine (condensation de deux résidus de DIT) et de la triiodothyronine (condensation d'un résidu MIT et d'un résidu DIT). Le mécanisme de ce couplage est obscur et plusieurs théories sont avancées : certains estiment que la tyrosine forme un radical libre intermédiaire, d'autres font intervenir une iodobenzoquinone, enfin l'intervention d'acide diiodohydroxyphénylpyruvique (DIHPPA) et d'acide monoiodohydroxyphénylpyruvique (MIHPPA) se couplant avec la DIT a été montrée *in vitro*. Cette dernière possibilité est d'autant plus intéressante que ces corps (MIHPPA et DIHPPA) ont été trouvés dans les dialysats de glandes thyroïdes, donc en dehors des structures protéiques.

Ensuite, l'hydrolyse de la thyroglobuline se fait sous l'action d'une série de protéases et de peptidases mal connues, avec libération des iodotyrosines et des iodothyronines. A ce stade, la MIT et la DIT sont rapidement désiodées sous l'action d'une iodotyrosine-déshalogénase, l'iodure libéré rentrant dans le cycle de synthèse, tandis que la triiodothyronine (T_3) et la thyroxine (T_4) ne sont pas déshalogénées et passent dans le sang.

Si ce schéma classique n'est pas contesté dans l'état actuel des recherches, le mécanisme de chaque étape n'est encore que très incomplètement connu, et encore moins leur déterminisme.

COMPARTIMENTS IODES INTRATHYROÏDIENS.

Lorsqu'on procède à une extraction du tissu thyroïdien par des tampons salins isotoniques, on distingue deux fractions :

- Une fraction soluble qui comprend :

- . Le compartiment macromoléculaire protéique : thyroglobuline, albumine iodée, protéines de contamination sanguine (sérum-albumine, hémoglobine, etc...).
- . Le compartiment micromoléculaire, dialysable, appelé encore compartiment libre, et qui contient les ions iodures, les acides aminés iodés et leurs dérivés métaboliques, les petits polypeptides.

- Une fraction insoluble,

définie comme se trouvant dans le culot de centrifugation pour un champ de 105 000 G. Cette fraction comprend en particulier les protéines iodées particulières.

1°) Le compartiment macromoléculaire.

Il contient environ 90 % de l'iode thyroïdien. Le principal composé est la thyroglobuline (TG).

Cette glycoprotéine, de masse moléculaire 660 000 et de constante de sédimentation 19 unités Svedberg (19S) a une structure mal connue. On sait que sous l'action de divers agents doux (urée, guanidine), elle se dissocie en deux fractions 12 S. L'action de réducteurs (sulfite, mercaptoéthanol) peut conduire à un clivage des liaisons covalentes (ponts disulfures) et donner des molécules ayant des constantes de sédimentation comprises entre 2 S et 8 S.

On a mis en évidence aussi une protéine iodée 27 S, que l'on retrouve constamment chez l'homme et qui représente de 5 à 10 % des protéines iodées. Cette molécule serait un plus haut polymère des sous-unités de la thyroglobuline.

La composition de la thyroglobuline en acides aminés paraît relativement constante d'une espèce à l'autre (1, 10, 11). On a encore peu de renseignements sur leur séquence et sur l'identité des acides aminés terminaux (11).

Enfin, 10 % de la masse de la thyroglobuline sont formés de chaînes polysaccharidiques renfermant du galactose, du mannose, de la N-acétylglucosamine, du fucose et de l'acide sialique (13). La proportion de chacun de ces composés varie d'une espèce à l'autre (12).

Comme nous l'avons dit, les acides aminés iodés de la thyroglobuline sont principalement MIT, DIT, T₃ et T₄. Des traces d'autres iodothyronines (3-3'-5' T₃ et 3-3' T₂), de mono et diiodohistidines ont été détectées.

Un fait important est la variabilité du taux d'iode de la thyroglobuline (0,18 à 0,87 mg d'iode pour 100 mg de thyroglobuline (9). La molécule "moyenne" de thyroglobuline humaine contient :

2 à 5 résidus de thyroxine,
6 à 10 résidus de DIT,
6 à 12 résidus de MIT,
moins de 1 résidu de T₃,
et environ 120 résidus de tyrosine (10).

Il est établi que lors de la biosynthèse hormonale, la synthèse protéique précède l'iodation. La thyroglobuline nouvellement formée, non iodée, a une constante de sédimentation de 16 à 17 S, et l'iodation de cette molécule conduit à la formation des unités 19 S.

Bien que la thyroglobuline constitue 80 % des protéines thyroïdiennes, il existe d'autres iodoprotéines dont on ignore le rôle exact et qui font l'objet de nombreux travaux. L'une d'elles, en particulier, a les propriétés physico-chimique et immunologique de la sérum-albumine. Le taux de ces iodoprotéines peut augmenter dans diverses affections thyroïdiennes.

2°) Le compartiment micromoléculaire.

A côté de ce compartiment protéique, l'existence d'iodure libre et d'iode organique non protéique a été mise en évidence. Cet iode, extractible par le butanol, représente 1 à 3 % de l'iode total. Cet iode organique comprend surtout MIT, DIT et de nombreux peptides iodés (5), certains de masse moléculaire inférieure à 2-3 000, d'autres plus lourds, dans lesquels l'iode se trouve sous forme de résidus MIT et DIT et quelquefois T₄. Ces peptides représentent la particularité d'être très résistants à l'hydrolyse enzymatique.

3°) Le compartiment iodé particulaire.

Ce compartiment correspond à l'iode se trouvant dans les particules sub-cellulaires (microsomes, ribosomes) et est défini arbitrairement comme l'ensemble des particules sédimentées à 105 000 G. Il représente 5 à 10 % de l'iode thyroïdien chez le sujet normal.

Des travaux effectués en particulier par Nunez (6,7) ont montré que l'iodation était plus rapide dans ces particules que dans la thyroglobuline. Cette fraction prend une importance particulière dans certains cas, par exemple chez l'animal dont on a bloqué la biosynthèse par la propyl-thio-uracile.

A côté de ces compartiments, il faut encore citer les phospholipides iodés, extractibles par le méthanol-chloroforme. L'iode de cette fraction est déchargeable par le perchlorate (et non par l'iodure) (6).

BUT DU TRAVAIL.

Notre travail a consisté à étudier la répartition des composés iodés dans l'adénome toxique et à la comparer à celle des tissus périnodulaires adjacents et de la glande humaine normale.

Cette étude a été réalisée par divers auteurs grâce à l'iode radio-actif et à la chromatographie sur papier. Depuis quelques années sont apparues des techniques de séparation quantitatives, autorisant un dosage de l'iode stable de ces différents composés. C'est une de ces techniques que nous avons utilisée.

Il nous a paru intéressant en effet de connaître la répartition de l'iode stable (iode 127) dans les composés iodés, celui-ci représentant l'état d'équilibre de la glande. Des techniques indirectes permettent d'évaluer cette répartition en réalisant un équilibre isotopique (3). Ce procédé est facilement réalisable chez l'animal, mais pratiquement inutilisable chez l'homme.

Pour ces raisons, seul le dosage direct de l'iode stable est possible et nous nous sommes attachés à choisir une technique qui nous permette cette évaluation.

Parallèlement au dosage de l'iode stable, nous avons mesuré l'iode radioactif incorporé dans la thyroglobuline et les acides aminés thyroïdiens, pour préciser la cinétique de renouvellement de ces molécules. Nous avons utilisé un double marquage par l'iode 131 et par l'iode 125 administrés à des temps différents avant le prélèvement de la glande.

Dans la première partie, nous passons en revue les principales techniques de séparation, de détection et de dosage des composés iodés, ainsi que les méthodes d'extraction et d'hydrolyse des protéines thyroïdiennes.

Dans la deuxième partie, consacrée à nos travaux personnels, nous rapportons l'étude critique des techniques employées et les résultats obtenus sur des glandes thyroïdes humaines normales et pathologiques.

° ° °
°

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BISMUTH J., ROLLAND M., LISSITZKY S.
Composition en acides aminés de thyroglobulines provenant de sujets euthyroïdiens et goitreux.
Acta Endocr. 1966, 53, 297-302.
- 2 - DE GROOT L.J.
Current views on formation of thyroid hormones.
New Eng. J. Med. 1965, 272, 243-250.
1965, 272, 297-303.
1965, 272, 355-362.
- 3 - ERMANS A. M., KINTHAERT J., CALAY R., GOOSSENS F., BASTENIE P.A.
Etude sur le métabolisme de l'iode intrathyroïdien et sur la nature de l'hormone circulante dans le goître simple.
La thyroïde. Etude clinique et physiopathologique. Problèmes actuels d'endocrinologie et de nutrition.
1 vol., L'expansion PARIS. 1964, série n° 8, 233-250.
- 4 - LISSITZKY S.
Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.
Colloque sur les hormones thyroïdiennes. Expos. Ann. Biochim. Med. XXVème série, Masson, PARIS, 1964, I-13.
- 5 - LISSITZKY S., BENABDELJLIL C., BERGOT J.
Sur les propriétés de certains iodopeptides dialysables thyroïdiens du rat et du mouton.
Ann. Endocr. 1965, 26, 683-690.
- 6 - NUNEZ J.
Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.
La thyroïde. Etude clinique et physiopathologique. Problèmes actuels d'endocrinologie et de nutrition.
L'Expansion, PARIS, 1964, série n° 8, 289-300.
- 7 - NUNEZ J., JACQUEMIN C.L., BRUN D., ROCHE J.
Etude in vitro des compartiments thyroïdiens par double marquage (125_I et 131_I).
Biochim. Biophys. Acta. 1965, 97, 404-406.
- 8 - PITT-RIVERS R., CAVALIERI R.R.
Thyroid hormone biosynthesis.
The thyroid gland. Vol. 1 Butterworths. LONDON 1964, 87-112.

- 9 - ROBBINS J., RALL J.E.
The iodine containing hormones.
Hormones in blood. 2nd. Ed. Vol 1.
GRAY CH. et BACHARACH Ed. Acad. Press. 1967, 383-490.

- 10 - ROLLAND M., BISMUTH J., FONDARA J., LISSITZKY S.
Composition en acides aminés de la thyroglobuline de différentes
espèces animales.
Acta Endocr. 1966, 53, 286-296.

- 11 - SPIRO M.J.
Studies on the protein portion of thyroglobulin.
J. Biol. Chem. 1970, 245, 5820-5826.

- 12 - SPIRO R.G., SPIRO M.J.
The carbohydrate composition of the thyroglobulin from several
species.
J. Biol. Chem. 1965, 240, 997-1013.

- 13 - WOLLMAN S.H.
Secretion of thyroid hormones.
Lysosomes in biology and pathology.
North Holland Publishing Co. AMSTERDAM 1969, Vol. 2, 483-512.

° °
°

PREMIERE PARTIE

METHODES DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES IODES

DANS LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.

Chapitre I

METHODES DE SEPARATION DES ACIDES AMINES IODES

Si la chromatographie de partage sur papier, associée aux isotopes radioactifs de l'iode, a permis à elle seule, de séparer et d'identifier les hormones thyroïdiennes et la plupart des composés iodés, d'autres techniques de séparation sont utilisées. Nous les exposons dans ce chapitre en présentant les avantages et les inconvénients de chacune d'elles.

1. ELECTROPHORESE DE ZONE.

L'électrophorèse sur papier, peu employée dans la séparation des acides aminés iodés, est utilisée pour séparer rapidement l'iode minéral des composés organiques pour en évaluer le pourcentage ou pour l'éliminer des préparations. Elle est surtout intéressante dans l'étude des protéines sériques vectrices des hormones thyroïdiennes.

Cependant certains auteurs ont eu recours à cette technique pour séparer les iodotyrosines des iodothyronines (35, 50).

La séparation est effectuée en général avec des tampons alcalins (véronal sodique, carbonate d'ammonium) à un pH d'environ 8, pour lequel les composés iodés migrent vers l'anode.

L'électrophorèse en haut voltage semble, pour certains, plus satisfaisante que la chromatographie sur papier (1) par sa rapidité et une meilleure séparation des composés en une seule dimension.

Les autres types d'électrophorèse sur gel d'amidon ou d'agar, sur acétate de cellulose, sur gel de polyacrylamide et sur colonne ne semblent pas avoir suscité d'intérêt dans l'étude des acides aminés iodés.

Par contre, l'association de l'électrophorèse sur papier et de la chromatographie sur papier (chromato-électrophorèse) a été utilisée avec profit (3, 21, 24).

On réalise une chromatographie sur papier dans une dimension, puis une électrophorèse dans une seconde dimension.

Cette technique a permis la séparation et l'identification de peptides iodés de masse moléculaire peu élevée (24).

2. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

A l'inverse de l'électrophorèse, la chromatographie sur papier a été et est toujours une méthode très employée. C'est en effet l'association de cette technique de séparation et l'utilisation de l'iode radioactif qui a permis la découverte de la triiodothyronine et l'étude de la plupart des composés thyroïdiens.

De nombreux systèmes de solvants (33, 34, 36, 49), sont employés. Quels qu'ils soient, une règle générale régit la séparation : les solvants acides séparent bien les iodotyrosines sans séparer les iodothyronines alors que les solvants alcalins agissent de façon inverse. Pour avoir une séparation complète de ces acides aminés il est nécessaire de pratiquer une chromatographie bidimensionnelle (le solvant acide dans une dimension, le solvant alcalin dans l'autre) ou deux chromatographies, l'une en milieu acide, l'autre en milieu alcalin ; ce dernier procédé est le plus simple à réaliser et semble le plus précis.

La migration peut être ascendante ou descendante ; le premier mode est le plus couramment employé.

Lorsque ces acides aminés sont séchés sur le papier filtre après leur dépôt, une désiodation non négligeable peut intervenir ; des précautions doivent être prises pour l'éviter (47, 48).

La bonne séparation des iodotyrosines, des iodothyronines et de leurs dérivés, explique l'utilisation fréquente de cette technique. Certains auteurs (43) ont cependant cherché à améliorer la séparation en opérant en deux dimensions sur du papier de diéthyléthylamino (DEAE) cellulose.

3. CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

L'application de la chromatographie en couche mince à la séparation des composés iodés du sérum et d'hydrolysats thyroïdiens est relativement récente.

Dans cette technique de séparation, deux facteurs principaux interviennent : l'adsorbant et le ou les systèmes de solvants. Les adsorbants les plus utilisés sont sans conteste le gel de silice (41, 42, 51, 52) et la cellulose (8, 9, 15, 44). Ouelette (30) utilise un mélange de ces deux adsorbants à concentrations variables. Ces conditions lui permettent de mieux séparer les iodotyrosines des iodothyronines.

Tous les systèmes de solvants employés jusqu'alors sont à base de produits organiques. Comme en chromatographie sur papier, les solvants acides donnent une meilleure séparation des iodotyrosines, les iodothyronines étant mieux individualisées en milieu alcalin.

Si l'on veut obtenir une bonne séparation à la fois des iodotyrosines et des iodothyronines, il faut opérer en deux dimensions (8, 9, 41, 44) ; certains auteurs emploient un système de solvants leur permettant d'opérer en une dimension (15, 51, 52). Shapiro et Gordon (42) emploient une formule mixte consistant à utiliser successivement deux systèmes de solvants dans une seule dimension.

La chromatographie en couche mince présente l'avantage sur la chromatographie sur papier d'être beaucoup plus rapide et très sensible, bien que cette dernière propriété soit limitée par le dépôt plus faible qu'autorise la chromatographie en couche mince.

4. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

Deux avantages président à son utilisation de plus en plus grande : la possibilité de travailler sur de grands échantillons, ce qui est particulièrement intéressant pour les milieux peu riches en composés iodés, et la possibilité de réaliser une évaluation quantitative des composés.

Ces constatations expliquent le rôle de plus en plus important de ces techniques.

Les premières chromatographies sur colonne furent réalisées sur des supports peu utilisés à l'heure actuelle : le kieselguhr, avec lequel Gross et Pitt-Rivers (13) ont séparé T_3 et T_4 et que Kennedy et collaborateurs (19) emploient pour séparer les acides aminés iodés d'hydrolysats thyroïdiens, l'amidon et la cellulose (7, 39, 40). Les éluions sont effectuées avec des solvants organiques comparables à ceux utilisés pour la chromatographie sur papier ou sur couche mince.

Il faut citer aussi les colonnes de chlorure d'argent utilisées pour retenir l'iodure, celui-ci formant avec le chlorure d'argent de l'iodure d'argent jaune, qui reste au sommet de la colonne. Cette propriété a été utilisée par Fletcher (10, 11) dans l'étude des composés iodés urinaires.

Ces différentes techniques sont presque abandonnées depuis l'apparition des résines échangeuses d'ions et du gel de dextrane.

4 - 1 Résines échangeuses d'ions.

C'est Blanquet (4) qui proposa les résines échangeuses d'ions pour la séparation des acides aminés iodés. Il en existe deux types :

- Les résines échangeuses d'anions type Dowex 1, les premières utilisées. Les acides aminés iodés sont retenus par échange d'ions mais aussi par adsorption (surtout pour les iodothyronines). Ceci explique la nécessité d'employer, pour l'éluion, des acides en association avec des solvants organiques polaires tensio-actifs (alcools butylique, isoamylique, etc...). De nombreux procédés, ayant chacun leur intérêt, ont été décrits (12, 25, 27, 28).
- Les résines échangeuses de cations, type Dowex 50, (37). L'iodure et les protéines sont éliminés de ces colonnes, et les acides aminés iodés retenus sont élués par l'ammoniaque 2M, ou des sels d'ammonium volatils (acétate, carbonate, formiate). Des méthodes automatiques ont été mises au point, permettant une évaluation quantitative en iode radioactif et même en iode stable des différents amino-acides thyroïdiens (6, 20, 38).

L'évaluation de l'iode hormonal peut être réalisée grâce à ces résines cationiques (2, 31).

L'emploi combiné de ces deux types de résines (5) permet de retenir l'iodure sur la résine échangeuse d'anions et les hormones sur la résine cationique tandis que les protéines ne sont pas retenues. Cette technique est très courante dans l'analyse des composés iodés sériques.

4 - 2 Gel de dextrane.

Lissitzky et ses coll. (23), Jacobsson et Wioström (16) ont montré que l'on pouvait séparer les acides aminés iodés en utilisant le gel de dextrane de granulation définie (Séphadex G 25), et ceci en utilisant des éluants suffisamment doux, sauf pour T₃ et T₄ qui sont plus fortement adsorbées et qui requièrent pour leur élution un solvant organique, le plus souvent l'amylo-tertiaire saturé d'ammoniaque 2M.

En effet, le phénomène de la gel filtration ne joue qu'un rôle secondaire pour les acides aminés iodés par rapport à l'adsorption de ces molécules sur le gel, adsorption due au cycle aromatique et au groupement phénol.

Cette technique a été appliquée au sérum hydrolysé (22), aux hydrolysats de glandes thyroïdes (23), et au sérum non hydrolysé pour déterminer l'iode lié aux protéines (16, 23), les iodoprotéines étant en effet exclues du gel avec des solvants aqueux de pH proche de la neutralité.

Certains auteurs (26, 29) ont montré qu'avec un éluant alcalin (soude 0,015 M), on pouvait rompre la liaison des iodothyronines avec les protéines sériques et éluer ces hormones. D'autres auteurs (17) emploient l'ammoniaque 2M comme éluant alcalin.

Le Séphadex G 25 permet un dosage de l'iode stable des aminoacides iodés et de l'iodure élués grâce à l'utilisation d'un solvant aqueux pour l'élution des iodotyrosines et de l'iodure. Les iodothyronines peuvent être réextraites de leur éluant organique par l'ammoniaque 2M. La plupart des techniques de chromatographie sur colonne citées précédemment ne permettaient pas ce dosage.

Ainsi Jones et Schultz (18) ont pu réaliser une évaluation quantitative automatique en iode 127 des composés iodés d'hydrolysats thyroïdiens.

5. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

Dernière technique mise en oeuvre pour séparer les composés iodés, en particulier les hormones thyroïdiennes et leurs isomères, la chromatographie en phase gazeuse paraît riche d'avenir.

Plusieurs points la rendent délicate et limitent encore son emploi :

- La nécessité d'extraire les hormones, étape toujours ingrate quoiqu'à l'heure actuelle, l'extraction des hormones thyroïdiennes soit assez bien connue et contrôlée.
- La nécessité de synthétiser des dérivés volatils des composés iodés et de les purifier.

Actuellement, deux sortes de dérivés sont employés : les dérivés méthylés sur la fonction acide de la chaîne acide aminée et possédant un groupement dipivalyle sur l'hydroxyle phénolique et sur la fonction aminée (45, 46) et les dérivés estérifiés sur les trois fonctions phénolique, acide et aminée par le groupement triméthylsyle (14). Des dérivés dont la fonction acide a été méthylée et les fonctions phénol et aminée estérifiées par le groupement trifluoroacétyle sont également utilisés (32).

Les détecteurs sont des détecteurs à flamme ou à capture d'électrons employant le nickel 63. Ce dernier type de détecteur est beaucoup plus sensible et tend à supplanter le détecteur à flamme.

Cette technique extrêmement sensible rend possible la détection et le dosage de quantités très faibles d'hormones thyroïdiennes ; elle est particulièrement intéressante pour le dosage de la triiodothyronine du sérum dont le taux doit se situer autour de 2 ou 3 nanogrammes par millilitre de sérum.

° °
°

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AROSENIUS K.E., PARROW A.
The separation of iodo-amino acids from thyroïd digests and blood serum, using anion-exchange resins and hight-voltage paper electrophoresis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1964. 16, 447-456.
- 2 - BACKER E.T., POSTMES Th. J., WIENER J.E.
Determination of thyroïd hormones in serum by means of a cation exchange resin and chloric acid digestion.
Clin. Chim. Acta. 1967, 15, 77-85.
- 3 - BJORKSTEN F., GRASBECK R., LAMBERG B.A.
Methods for the paper chromatographic and paper electrophoretic separation of iodide, iodotyrosines, iodothyronines and their derivatives.
Acta. Chem. Scand. 1961, 15, 1165-1176.
- 4 - BLANQUET P., MEYNIEL G., MOUNIER J., TOBIAS C.A.
A propos des résines échangeuses d'anions Dowex 1 et 2. Séparation immédiate de l'iode organique et de l'iode minéral. Dosage rapide des acides aminés marqués au moyen de l'iode 131.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 419-424.
- 5 - BLANQUET P., MEYNIEL G., SAVOIE J.C.
Résines échangeuses d'ions et métabolisme thyroïdien. Déterminations quantitatives portant sur le plasma.
C.R. Acad. Sci. Paris 1960, 250, 217-219.
- 6 - BLOCK R.J., MANDL R. H.
Automatic analysis of iodo amino acids and of iodide in digests of iodinated proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 102, 87-95.
- 7 - DOBYNS B.M., BARRY S.R.
The isolation of iodinated amino acids from thyroïd tissue by means of starch column chromatography.
J. Biol. Chem. 1953, 204, 517-531.
- 8 - FAIRCLOTH M.A., WILLIAMS A.D., FLORSHEIM W. H.
A thin-layer chromatography. Method for the analysis of thyroïdal iodoamino acids.
Anal. Biochem. 1965, 12, 437-443.

- 9 - FAVINO A., EMRICH D., VON ZUR MULHEN A.
Separation and quantitative determination of ^{131}I -T₃ and ^{131}I -Thyroxine in human plasma by thin layer chromatography.
Acta. Endocr. 1967, 54, 362-374.
- 10 - FLETCHER K.
The fractionation of urinary iodine. I-Method of analysis Biochem. J. 1957, 67, 136-140.
- 11 - FLETCHER K.
The fractionation of urinary iodine. II-Metabolites excreted during treatment of carcinoma of the thyroid.
Biochem. J. 1957, 67, 140-146.
- 12 - GALTON V.A., PITT-RIVERS R.
A quantitative method for the separation of thyroid hormones and related compounds from serum and tissues with an anion exchange resin.
Biochem. J. 1959, 72, 310-313.
- 13 - GROSS J., PITT-RIVERS R.
3-5-3' triiodothyronine I. Isolation from thyroid gland and synthesis.
Biochem. J. 1953, 53, 645-650.
- 14 - HANSEN L.B.
Gas-liquid chromatography separation of thyroid hormones.
Anal. Chem. 1968, 40, 1587-1589.
- 15 - HOLLINGSWORTH D.R., DILLARD M., BONDY P.K.
Separation of iodoaminoacids and related compounds by thin layer chromatography.
J. Lab. Clin. Med. 1963, 62, 346-350.
- 16 - JACOBSSON L., WIOSTRÖM G.
Separation of iodine compound in serum by gel filtration.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1962, 14, 285-288.
- 17 - JONES J.E., SCHULTZ J.S.
Determination of the thyroxine iodine content of serum contaminated by organic iodine. A method based on gel filtration.
J. Clin. Endocr. 1967, 27, 877-884.
- 18 - JONES J.E., SCHULTZ J.S.
Identification of thyroidal iodoamino acids by gel filtration and automated ^{127}I determination.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 975-985.
- 19 - KENNEDY T.H.
The quantitative determination of the iodo amino acids of thyroid tissue.
Austr. J. Biol. Sci. 1958, 11, 106-113.

- 20 - LERNER S.R.
Iodinated amino acids chromatography on polystyrene resins.
Arch. Biochem. 1963, 103, 36-41.
- 21 - LISSITZKY S., BENEVENT M.T., ROQUES M., ROCHE J.
Sur la désiodation des iodotyrosines et des hormones thyroïdiennes par le foie de rat. Mise en évidence des produits formés.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, 41, 1329-1344.
- 22 - LISSITZKY S., BISMUTH J.
Détermination quantitative de la composition du sérum en ^{131}I -thyroxine et ^{131}I -triiodothyronine par filtration sur gel de dextran (sephadex).
Clin. Chim. Acta. 1963, 8, 269-276.
- 23 - LISSITZKY S., BISMUTH J., ROLLAND M.
Séparation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextran (sephadex).
Clin. Chim. Acta. 1962, 7, 183-189.
- 24 - LISSITZKY S., HANEY J.B.
Dialysis and chromato electrophoresis for the separation of thyroidal iodo compounds.
Arch. Biochem. 1962, 99, 1-7.
- 25 - LISSITZKY S., LASRY S.
Séparation sur résines échangeuses d'ions avec élution par gradient d'acidité des acides aminés iodés thyroïdiens et de 5-hydroxy-3-iodotyrosine.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 609-618.
- 26 - MAKOWETZ E., MÜLLER K., SPITZY H.
Separation and determination of thyroid hormones in the nanogram range based on the sorption properties of sephadex.
Microchem. J. 1966, 10, 194-201.
- 27 - MEYNIEL G.
L'utilisation des résines échangeuses d'ions pour l'étude de la cinétique de formation des tyrosines et thyronines iodées dans la glande thyroïde.
Thèse Sciences Drouillard. Imp. BORDEAUX 1958.
- 28 - MEYNIEL G., BLANQUET P., MOUNIER J., ESTIBOTTE M.
Sur la séparation qualitative et quantitative des acides aminés iodés thyroïdiens par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Dowex).
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 369-377.
- 29 - MOUGEY E.H., MASON J.W.
Separation of some iodoamino acids and iodide by gel filtration
Anal. Biochem. 1963, 6, 223-233.

- 30 - OUELETTE R.P., BALCIUS J.F.
A thin layer system for separation of iodine containing compounds using binary mixtures of adsorbents.
J. Chromatogr. 1966, 24, 465-468.
- 31 - PIETTE C., SAVOIE J.C., PIETTE M., GUILLOSSON J.J.
Détermination de l'iode total et de l'iode hormonal dans le sérum sanguin au moyen d'un autoanalyseur.
Ann. Biol. Clin. 1966, 24, 393-404.
- 32 - RICHARDS A.H., MASON W.B.
Gas chromatographic separation of some iodine compounds of serum
Anal. Chem. 1966, 38, 1751-1752.
- 33 - ROBBINS J., RALL J.E.
The iodine containing hormones.
"Hormones in blood" 2nd. Ed. Vol. 1.
Edited by GRAY Ch. and BACHARACH Al. Acad. Press. 1967, 383-490.
- 34 - ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R.
Chromatographic analysis of radioactive iodine compounds from the thyroid gland and body fluids.
"Methods of Biochemical analysis" GLICK D. Ed. 1954. Vol. 1, 243-264
Intersciences New-York.
- 35 - ROCHE J., MICHEL R., CLOSON J., MICHEL O.
Sur le métabolisme du sulfoconjugué de la 3-5-3' triiodothyronine chez le rat.
Biochim. Biophys. Acta. 1960, 38, 325-332.
- 36 - ROCHE J., MICHEL R., LISSITZKY S.
Analysis of natural radioactive compounds by chromatographic and electrophoretic methods.
"Methods of biochemical analysis" GLICK D. Ed. 1964. Vol. XII, 143-182.
Intersciences New-York.
- 37 - ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J.
Sur la présence des 3-3' diiodothyronine et 3-3'-5' triiodothyronine dans la thyroglobuline de porc.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 361-368.
- 38 - ROLLAND M., AQUARON R., LISSITZKY S.
Thyroglobulin iodoamino acids estimation after digestion with pronase and leucylaminopeptidase.
Anal. Biochem. 1970, 33, 307-317.
- 39 - ROSENBERG I.N.
Column chromatography of thyroid glands hydrolysates.
J. Clin. Endocr. 1951. 11, 1063-1078.

- 40 - ROSENBERG I.N.
The nature of the circulating thyroïd hormone in Graves'disease.
J. Clin. Invest. 1951, 30, 1-10.
- 41 - SCHNEIDER G., SCHNEIDER C.
Dünnschichtchromatographic von iodaminosäuren.
Z. Physiol. Chem. Dtsch. 1963, 332, 316-318.
- 42 - SHAPIRO O., GORDON A.
An improved method for separation of radioactive thyroïd hormone metabolites by thin layer chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966, 121, 577-579.
- 43 - SLEEMAN H.K., DIGGS J.W.
Two dimensional chromatography of iodoamino acids on DEAE-cellulose paper.
Anal. Biochem. 1964, 8, 532-535.
- 44 - SOFIANIDES T., MELONI C.R., ALGER E., CANARY J.J.
Separation and quantitative recovery of iodinated amino acids and iodide by thin layer chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966, 123, 646-650.
- 45 - STOUFFER J.E.
Gas chromatography of thyroïd hormones.
J. Chromat. Sci. 1969, 7, 124-126.
- 46 - STOUFFER J.E., JAAKONMÄKI P.I., WENGER T.J.
Gas liquid chromatographic separation of thyroïd hormones.
Biochem. Biophys. Acta 1966, 127, 261-263.
- 47 - TAUROG A.
Spontaneous deiodination of ^{131}I -labeled thyroxine and related iodophenols on filter paper.
Endocrinology 1963, 73, 45-46.
- 48 - TAUROG A.
Spontaneous deiodination of ^{131}I -labeled thyroïd extracts on filter paper.
Endocrinology 1963, 73, 57-62.
- 49 - TAUROG A., CHAIKOFF I.L.
Synthetic and analytic procedures involving ^{131}I -labeled compounds.
Methods in enzymology 1957. Vol. IV, 856-882.
- 50 - TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L.
An unidentified iodine compound formed by incubation of cell-free preparations of tissue with iodine- ^{131}I .
J. Biol. Chem. 1957, 227, 759-784.

- 51 - WEST C.D., CHAVRE V.J., WOLFE M.

A serum thyroxine method : application in thyroid disease and iodine-treated patients.

J. Clin. Endocr. 1965, 25, 1189-1195.

- 52 - WEST C.D., WAYNE A.W., CHAVRE V.J.

Thin layer chromatography for thyroid hormones.

Anal. Biochem. 1965, 12, 41-48.

° °
°

Chapitre II

METHODES D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES IODES.

Nous n'envisagerons pas, dans ce chapitre, la méthode spectrophotométrique de Edelhoich (6) qui dose les acides aminés iodés sur la thyroglobuline intacte, pour nous limiter aux techniques utilisées après séparation des composés.

On peut séparer les méthodes d'estimation qualitatives ou semi-quantitatives, appliquées aux électrophorégrammes et aux chromatogrammes sur papier ou sur plaque, des méthodes quantitatives, qui peuvent être mises en oeuvre sur les éluats de chromatographie sur colonne.

1. METHODE D'ESTIMATION QUALITATIVE ET SEMI-QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES IODES.

1 - 1 Réactifs de l'iode et des acides aminés iodés.

Dans ces méthodes, la quantité de produit soumis à l'analyse est en général très faible. Il est donc nécessaire de posséder des réactions d'identification très sensibles.

- La réaction à la ninhydrine qui révèle la fonction aminée est très sensible (20 à 30 μg), mais non spécifique des acides aminés iodés.
- La réaction de Pauly (diazoréaction) est spécifique du groupement phénol et de sensibilité à peu près identique à celle de la ninhydrine.
- La réaction utilisant le système sulfate cérique-anhydride arsénieux en milieu acide (2) est très sensible (jusqu'à 0,01 μg), et spécifique de l'iode et des composés iodés. Son inconvénient majeur est d'être instable (en raison de l'iode atmosphérique) et le support papier, soumis à des réactifs acides, s'effrite au bout de quelques semaines. On peut y suppléer en traçant les spots sur un autre papier ou par photographie. Des modifications ont été apportées, en particulier par Mandl et Block (11).
- L'iodure est révélé par le nitrate d'argent ou mieux, par une solution à 1 % de chlorure de palladium qui, par pulvérisation, permet de détecter de 1 à 5 μg d'iodure. Cette réaction est spécifique de l'iode sous forme ionique I^- .

Les composés radioactifs sont révélés facilement par autoradiographie ou radiochromatographie. Leur identification se fait par adjonction au mélange à analyser de témoins stables (de l'ordre de 50 à 100 μg) révélés par les réactions chimiques citées précédemment.

Tous ces moyens de détection énumérés ci-dessus peuvent être utilisés à des fins de dosage plus ou moins précis.

1 - 2 Mesure de la radioactivité après marquage.

On peut apprécier la proportion de chacun des produits radioactifs en passant la bande de papier ou la plaque sur un appareil de détection du type Geiger-Muller, ou à cristal, muni d'un système mécanique permettant le déroulement continu ou par paliers de la bande. Le taux de comptage obtenu pour chacune des portions de la bande en section de 3 à 5 mm de large, chaque section étant comptée dans un compteur à cristal creux.

On peut également utiliser l'autoradiographie en photométrant les taches laissées sur la pellicule après révélation. Les parties du chromatogramme ou de l'électrophorèse situées en regard des zones de noircissement du film radiographique peuvent aussi être révélées et photométrées, ou mieux éluées, les réactions d'identification et de dosage étant pratiquées sur l'éluat.

2. DOSAGE CHIMIQUE. MINERALISATION SUIVIE DU DOSAGE DE L'IODE PAR SON ACTION CATALYTIQUE SUR LA REDUCTION DE L'ION CERIQUE.

Toutes les méthodes quantitatives utilisées jusqu'alors pour les acides aminés iodés reposent sur l'évaluation de l'iode qu'ils contiennent. Il est donc nécessaire d'avoir une méthode de séparation qui permette d'obtenir ces composés isolés, sous une forme où le dosage de l'iode soit possible. La chromatographie sur colonne est une de ces techniques.

L'iode dans les milieux biologiques se trouve en majeure partie sous forme organique et son dosage implique donc une minéralisation préalable pour l'amener sous forme minérale.

Cette minéralisation peut se faire en milieu alcalin à 600° C (17) l'iode étant transformé en iodure peu volatil, ou en milieu acide. Divers oxydants ont été utilisés : le permanganate de potassium en milieu sulfurique (15), le mélange acide chromique-acide sulfurique (3, 12), l'acide chlorique en présence de chromate de sodium (19), ou non (9), le mélange acide sulfurique-acide perchlorique-acide nitrique. Lors de cette minéralisation acide, l'iode organique est transformé en acide iodique ou iodate, que l'on peut réduire ensuite en iode volatil, ou le doser directement.

Le dosage de l'iode minéral se fait par la méthode de Sandell et Kolthoff (18) qui utilise la propriété de l'iode de catalyser la réaction de réduction du sulfate cérique par l'anhydride arsénieux :



En présence d'un excès d'anhydride arsénieux, cette réaction est monomoléculaire et la vitesse de réaction proportionnelle à la concentration de l'iode présent.

En pratique, on mesure la décoloration du sulfate cérique en fonc-

tion du temps, à une longueur d'onde comprise entre 410 et 430 nanomètres. A ces longueurs d'onde, le logarithme de la densité optique de la solution est une fonction sensiblement linéaire du logarithme de la concentration en sulfate cérique.

Des variantes ont été introduites pour mesurer le degré de réduction du sulfate cérique (16, 10, 8, 14, 13).

3. DOSAGE PAR ACTIVATION NEUTRONIQUE.

L'analyse par activation est applicable à l'iode, la réaction nucléaire du type (n, γ) conduisant à l'iode 128 de période 25 minutes, selon la réaction :



Cet iode émet des particules β et des photons γ et peut être mesuré grâce à l'un ou l'autre de ces rayonnements. (4)

Lors de l'irradiation, tous les éléments de l'échantillon sont devenus radioactifs si bien que, lorsqu'on opère en milieu complexe, on est obligé de procéder à une séparation de l'iode ou du composé iodé à doser.

Les techniques classiques sont applicables. Il peut s'agir soit d'un traitement chimique consistant en une minéralisation acide par la méthode de Chaney (la minéralisation alcaline est à éliminer du fait de la radioactivité importante que pourrait amener le carbonate de sodium), soit d'une séparation du composé par résines échangeuses d'anions ou de cations (4, 5, 7) ou de toute autre méthode de séparation.

Ce traitement peut cependant être évité lorsque la concentration de l'iode est très nettement supérieure aux concentrations des autres éléments susceptibles d'interférer. Cela est vrai pour le dosage de l'iode du tissu thyroïdien.

Cette méthode est très sensible, mais le fait qu'elle n'élimine pas tous les traitements nécessaires à la séparation de l'iode et la nécessité d'une pile atomique à proximité (la période de l'iode 128 étant courte) limitent son emploi.

4. MESURE DE LA RADIOACTIVITE.

Les mesures de l'iode radioactif 131 et 125 des fractions collectées sont réalisées à l'heure actuelle à l'aide de compteurs à scintillation à cristal creux d'iodure de sodium activé au thallium, équipés de spectromètre gamma permettant la discrimination des isotopes présents. On peut aussi mesurer en continu la radioactivité en faisant passer l'éluat sortant de la colonne devant un compteur Geiger, ou mieux dans un serpentín situé à l'intérieur d'un cristal-puits relié à une électronique de comptage et à un enregistreur, les courbes ainsi obtenues pouvant être évaluées par planimétrie.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BARKER S.B., HUMPHREY M.J., SOLEY M.H.
The clinical determination of protein-bound iodine.
J. Clin. Invest. 1951, 30, 55-62.
- 2 - BOWDEN C.H., MAC LAGAN N.F., WILKINSON J.H.
The application of the ceric sulphate arsenious acid reaction to the detection of thyroxine and related substances.
Biochem. J. 1955, 59, 93-97.
- 3 - CHANEY A.L.
Improvement in determination of iodine in blood. Industrial and engineering chemistry. Analytical edition 1940, 12, 179-181.
- 4 - COMAR D.
Dosage de l'iode dans les milieux biologiques au moyen de l'analyse par radioactivation.
Thèse de pharmacie. Paris, 1962.
- 5 - COMAR D., RIVIERE R., KELLERSHOHN C.
Le dosage de l'iode au moyen de l'analyse par radioactivation et ses applications en physiopathologie thyroïdienne.
3ème colloque International de Biologie de Saclay. Septembre 1963
- 6 - EDELHOCH H.
The properties of thyroglobulin VIII. The iodination of thyroglobulin.
J. Biol. Chem. 1962, 327, 2778-2787.
- 7 - FEDMAN M.H., Mc NAMARA J., REBA R.C., WEBER W.
Protein-bound iodine determination by activation analysis.
J. Nucl. Med. 1967, 8, 123-131.
- 8 - FISCHL J.
Determination of protein-bound iodine in micro-amounts of serum or plasma.
Clin. Chim. Acta. 1956, 1, 462-469.
- 9 - GOODWIN J.F., HAHN R.B., BOYLE A.J.
Chloric acid method for determining protein-bound iodine by use of iodine 131.
Anal. Chem. 1957, 29, 1681-1684.

- 10 - GROSSMANN A., GROSSMANN G.F.
Protein-bound iodine by alkaline incineration and a method for producing a stable cerate color.
J. Clin. Endocr. 1955, 15, 354-361.
- 11 - MANDL R.H., BLOCK R.J.
Methods for the qualitative, semi quantitative and quantitative determination of iodoamino acids and of inorganic iodide and iodoprotein digests and in human serum.
Arch. Biochem. 1959, 81, 25-35.
- 12 - MATTHEWS N.L., CURTIS G.M., BRODE W.R.
Determination of iodine in biological materials. Refinement of the chromium trioxide oxidation method.
Industrial and engineering chemistry. Analytical Edition 1938, 10, 612-615.
- 13 - MEYER K.R., DICKENMAN R.C., WHITE E.G., ZAK B.
Study of inhibition of the ceric-arsenite reaction and application to analysis of protein-bound iodine.
Amer. J. Clin. Path. 1955, 25, 1160-1170.
- 14 - PIETTE C., PIETTE M.
Dosage de l'iode protéique du serum.
Ann. Biol. Clin. 1960, 18, 438-444.
- 15 - RIGGS D.S., MAN E.B.
A permanganate acid ashing micromethod for iodine determination.
1. Values in blood of normal subjects.
J. Biol. Chem. 1940, 134, 193-211.
- 16 - ROGINA B., DUBRAVCIC M.
Microdetermination of iodides by arresting the catalytic reduction of ceric ions.
Analyst 1953, 78, 594-599.
- 17 - SALTER W.T., Mc KAY E.A.
Iodine in blood and thyroid of man and small animals.
Endocrinology 1944, 35, 380-390.
- 18 - SANDELL E.B., KOLTHOOF I.M.
Microdetermination of iodine by a catalytic method.
Mikrochim. Acta 1937, 1, 9-25.
- 19 - ZAK B., WILLARD H.H., MYERS G.B., BOYLE A.J.
Chloric acid method for determination of protein-bound iodine.
Anal. Chem. 1952, 24, 1345-1348.

Chapitre III

DU TISSU A L'HYDROLYSAT THYROÏDIEN

Dans la thyroïde, les acides aminés existent sous deux états : libres (12), formant avec l'iodure et les peptides iodés le compartiment libre, ou intégrés à la chaîne polypeptidique des protéines, principalement la thyroglobuline.

Si l'on veut faire une étude quantitative globale de ces acides aminés il est donc nécessaire d'extraire à la fois le compartiment libre et les protéines puis d'hydrolyser ces dernières. On a alors un hydrolysat renfermant la totalité des acides aminés iodés thyroïdiens (à l'exception toutefois de ceux contenus dans les peptides iodés, difficilement hydrolysables).

1. EXTRACTION PAR LES SOLUTIONS SALINES.

Le premier temps de cette étape consiste à traiter le tissu thyroïdien prélevé.

Deux techniques sont habituellement employées pour l'extraction :

- La technique par diffusion où le tissu congelé est découpé en fines tranches (3) laissées en suspension dans le solvant d'extraction à une température voisine de + 4°, pendant des temps allant de 3 heures à 48 heures (24).
- La technique par broyage plus ou moins poussé du tissu, (14, 23) à l'aide d'homogénéiseurs à grande vitesse.

Ces deux techniques donnent des résultats pratiquement identiques (24).

Quel que soit le mode d'extraction, le choix du solvant est important. Les solutions salines diluées sont habituellement employées, l'intérêt de leur utilisation résidant dans le phénomène du "salting-in". Ces solutions extraient à la fois les composants du compartiment libre et les protéines thyroïdiennes.

On a intérêt à opérer à un pH le plus éloigné possible du pH isoélectrique de la thyroglobuline, sans toutefois dégrader les composés extraits. Aussi ces solvants sont tamponnés aux environs de pH = 7 par différentes solutions tampons.

La force ionique se situe vers 0,10 - 0,15.

De même, on peut avoir intérêt à utiliser un solvant isotonique si l'on ne veut pas extraire le contenu cellulaire.

A partir de ces différentes données, de nombreuses solutions d'extraction sont utilisées : NaCl 0,15 M (3, 23, 24) tampon phosphate 0,10 à 0,15 M, tampon tris-HCl-NaCl 0,15 M (4).

Ces solutions sont employées à raison de 3 à 4 ml par gramme de tissu frais.

A la suite de la macération ou du broyage des tissus dans le solvant, l'extrait est séparé par centrifugation : 10 000 tours/mn pendant 1 heure si on opère par diffusion, 100 000 G pendant 1 heure si on opère par broyage. Une centrifugation à basse température est préférable. On peut, avant la centrifugation, filtrer sur gaze.

2. HYDROLYSE DE L'EXTRAIT.

2 - 1 Hydrolyse acide ou alcaline.

On utilise en général pour l'hydrolyse acide l'acide chlorhydrique 6 N. L'hydrolyse se fait à 110° en tubes scellés sous vide, pendant 20 à 70 heures (13). Cette technique, employée pour la détermination de la composition de la thyroglobuline en acides aminés totaux (16) n'est pas recommandée pour les acides aminés iodés qui sont très fragiles et qui se désiodent facilement en milieu acide. Toutefois, elle reste applicable lorsque l'hydrolyse enzymatique est insuffisante, comme l'ont montré Blanquet, Meyniel et coll.(1) pour l'hydrolyse de composés iodés inconnus très résistants aux enzymes.

L'hydrolyse par la soude ou la baryte à chaud était la plus employée avant l'introduction des enzymes.

Leland et Foster (10) ont montré que 83 % de la T₄ ajoutée à un échantillon de tissu thyroïdien étaient retrouvés après hydrolyse par la soude 2 N. Cela semblait montrer une destruction appréciable de la T₄ lors de l'hydrolyse. Ces mêmes auteurs montrèrent aussi que la destruction de la T₄ endogène était plus faible que celle de la T₄ ajoutée.

Blau (2) préconisa l'hydrolyse par la baryte à 8 % à chaud, qui paraissait moins nocive pour la T₄.

Les résultats de Leland et Foster et de Blau ont été confirmés par Taurog et Chaikoff (18) qui ont montré cependant que les taux de T₄ obtenus avec la baryte étaient beaucoup plus inconstants qu'avec la soude 2 N.

Par contre, la DIT serait moins détruite par l'hydrolyse sodique que par la baryte (11) bien que Taurog, Tong et Chaikoff (20) trouvent des taux identiques de MIT et DIT avec ces deux modes d'hydrolyse.

Il semble qu'actuellement l'hydrolyse chimique soit abandonnée dans l'étude de la composition des tissus thyroïdiens en acides aminés iodés.

LISSITZKY dans sa thèse (11) a montré, en comparant les méthodes chimique et enzymatique d'hydrolyse de la thyroglobuline, que la désiodation des acides aminés iodés était beaucoup trop importante par voie alcaline pour que celle-ci reste valable en regard de l'hydrolyse enzymatique.

2 - 2 Hydrolyse enzymatique.

Elle a été préconisée par Hutchison dès 1898 (7) et utilisée plus tard par Harington et ses collaborateurs (5, 6) qui ont ainsi isolé la DIT et la T₄ par digestion de la thyroglobuline par la pepsine et la trypsine.

L'hydrolyse par les enzymes pose le problème du choix de cette enzyme en fonction du substrat, certaines protéinases pouvant agir plus ou moins bien et différemment selon le substrat. Ainsi Roche et coll. (15) en faisant agir la trypsine et la pepsine sur la thyroglobuline et des protéines artificiellement iodées ont montré la différence d'action de ces enzymes selon la protéine utilisée comme substrat. Ils ont mis en évidence en particulier une libération par la pepsine des iodotyrosines de tous les substrats utilisés, alors que la trypsine n'en libère que de la thyroglobuline.

On voit donc l'importance que revêt le choix de l'enzyme.

Lissitzky dans sa thèse (11), étudiant l'hydrolyse de la thyroglobuline par différentes enzymes (trypsine brute, trypsine cristallisée, pepsine cristallisée, chymotrypsine cristallisée, papaïne brute) a montré :

- Que la trypsine et la papaïne brutes libéraient 80 à 85 % de l'iode radioactif sous forme de fractions de poids moléculaire faible, solubles dans le butanol à pH = 1.
- Que l'hydrolyse libérait progressivement les différents acides aminés iodés et leurs peptides à des vitesses inégales, la MIT apparaissant le plus précocement, puis la DIT et T₄, l'hydrolyse atteignant son maximum au bout de 48 heures.
- Que l'hydrolyse par la pepsine cristallisée pendant 48 heures laissait une quantité de peptides plus importante qu'avec les autres enzymes.
- Que l'enzyme la plus active semblait être la trypsine brute (employée à un taux de 1 % du poids de la thyroglobuline) qui renferme des peptidases ce qui explique sa forte activité hydrolysante.

Tong et Chaikoff (21) étudiant 5 pancréatines de provenances différentes, en variant les conditions de l'hydrolyse, ont trouvé que la Viokase (Viobin Corporation) était la plus active. Ils ont ainsi montré qu'à un pH situé entre 8 et 9, le tampon utilisé avait peu d'importance, mais par contre l'addition de cations métalliques comme le manganèse (Mn⁺⁺), le calcium (Ca⁺⁺), le magnésium (Mg⁺⁺) augmentait l'hydrolyse en diminuant l'iode radioactif restant sur la ligne de dépôt et en augmentant l'iode thyroxinien,

les taux de MIT et DIT n'étant pas changés de façon significative.

Dans leurs expériences, l'addition de sulfate de manganèse 0,005 M augmente le taux de T_4 de 25 à 80 %. De plus ces cations ont une action sur la vitesse de libération de la T_4 . Leur mécanisme d'action n'est pas très clair et les auteurs suggèrent que ces ions métalliques agissent, au moins en partie, en activant les métallo-peptidases présentes dans la pancréatine ou en stabilisant la T_4 libérée en formant une sorte de complexe avec elle.

Tong et Chaikoff ont également constaté que la MIT est plus rapidement libérée de son support protéique (1 heure environ) que la DIT (environ 10 heures), le temps d'apparition de la T_4 étant variable mais généralement plus long que celui des iodotyrosines (8 à 24 heures).

Il n'est d'ailleurs pas souhaitable de prolonger l'hydrolyse, le pourcentage de T_4 retrouvé diminuant à partir de la 24ème heure, le taux retrouvé après 3 jours étant de 65 %. Cette diminution de thyroxine s'accompagne d'une augmentation des composés iodés inorganiques.

Comme Taurog, Potter, Chaikoff l'avaient préconisé auparavant (19) ils ajoutent pendant l'hydrolyse un antithyroïdien, le thiouracile, agent réducteur qui agirait en prévenant d'éventuels changements provenant d'une oxydation de l'iode inorganique.

Dans une récente étude, Kenjirio Inoue (8) a montré que le méthylmercapto-imidazol (MMI), antithyroïdien et réducteur comme le thiouracile avec l'avantage d'être plus soluble, avait la même action. De plus les taux de T_3 et de T_4 trouvés augmentent si l'hydrolyse est effectuée en milieu anaérobie.

Inoue et Taurog (9) ont obtenu les mêmes résultats lors de l'hydrolyse par la pronase, enzyme retirée de streptomyces griseus.

Tout ceci est en faveur de l'intervention de mécanismes oxydatifs sur la désiodation de la T_4 , bien qu'ils n'en soient pas la seule cause, de l'iode inorganique apparaissant encore en milieu anaérobie.

Si la perte des iodothyronines peut provenir d'une désiodation, comme l'ont montré Tong, Raghupathy et Chaikoff (22), elle peut provenir aussi d'une adsorption préférentielle de celles-ci sur les particules de l'hydrolysats (17). On observe en effet un taux de T_4 dans les surnageants d'hydrolysats inférieur à celui des hydrolysats totaux après agitation. Ceci montre la nécessité de bien agiter l'hydrolysats avant de l'analyser et non pas de le centrifuger pour obtenir un surnageant clair.

Actuellement, les deux enzymes les plus utilisées sont la viokase et la pronase qui donnent des résultats à peu près équivalents. D'après Tong, Raghupathy et Chaikoff (22), la pronase donne une proportion un peu plus élevée de DIT (17).

Tous ces travaux montrent la complexité des mécanismes intervenant dans l'hydrolyse et le soin à prendre pour obtenir des résultats valables.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BLANQUET P., MEYNIEL G., BERGER J.A., CROIZET M.
Nature et action physiologique d'une nouvelle substance organique iodée : le tyrosil-tyrosine tétra-iodé.
C.R. Acad. Sci. Paris. 1964, 259, 671-674.
- 2 - BLAU N.E.
The determination of thyroxine in thyroid substance.
J. Biol. Chem. 1935, 110, 351-363.
- 3 - DERRIEN Y., MICHEL R., ROCHE J.
Recherches sur la préparation et les propriétés de la thyroglobuline pure. I
Biochim. Biophys. Acta. 1948, 2, 454-470.
- 4 - FONTAINE Y.A., LACHIVER F.
Sur l'iodination in vitro des diverses protéines thyroïdiennes chez le rat normal et hypophysectomisé.
C.R. Acad. Sci. 1964, 259, 3637-3640.
- 5 - HARRINGTON C.R., RANDALL S.S.
The isolation of d-3 : 5-diiodotyrosine from the thyroid gland by the action of proteolytic enzymes.
Biochem. J. 1931, 25, 1031-1036.
- 6 - HARRINGTON C.R., SALTER W.T.
The isolation of l-thyroxine from the thyroid gland by the action of proteolytic enzymes.
Biochem. J. 1930, 24, 456-471.
- 7 - HUTCHISON M.D.
Further observations on the chemistry and action of the thyroid gland.
J. Physiol. 1898, 23, 178-189.
- 8 - INOUE K.
Studies on deiodination occurring during pancreatin digestion of thyroid homogenates and its prevention by methimazole.
Endocrinology 1966, 79, 601-607.
- 9 - INOUE K., TAUROG A.
Digestion of ¹³¹I-labeled thyroid tissue with maximum recovery of ¹³¹I-iodothyronine.
Endocrinology 1967, 81, 319-332.

- 10 - LELAND J.P., FOSTER G.L.
A method for the determination of thyroxine in the thyroid.
J. Biol. Chem. 1932, 95, 165-179.
- 11 - LISSITZKY S.
Biochimie des acides aminés iodés marqués par l'iode 131 dans le corps thyroïde.
Thèse Doct. Sci. Paris 1952.
- 12 - LISSITZKY S., BENABDELJLIL C., BERGOT J.
Sur les propriétés de certains iodopeptides dialysables thyroïdiens du rat et du mouton.
Ann. Endocr. 1965, 26, 683 - 690.
- 13 - MOORE S., STEIN W.H.
Chromatographic determination of amino-acids by the use of automatic recording equipment.
Methods in enzymology
Acad. Press New-York. 1963, VI, 819-831.
- 14 - NUNEZ J., JACQUEMIN C.L., BRUN D., ROCHE J.
Etude in vitro des compartiments thyroïdiens par double marquage (125 I et 131 I).
Biochim. Biophys. Acta 1965, 97, 404-406.
- 15 - ROCHE J., MICHEL R., LISSITZKY S., YAGI Y.
Action de la pepsine et de la trypsine sur la thyroglobuline et les protéines artificiellement iodées marquées par l'iode 131 .
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954, 36, 143 - 157.
- 16 - ROLLAND M., BISMUTH J., FONDARAI J., LISSITZKY S.
Composition en acides aminés de la thyroglobuline de différentes espèces animales.
Acta Endocrin. 1966, 53, 286-296.
- 17 - ROSENBERG L.L., LAROCHE G.
Determination of iodoamino acid composition of rat thyroidal iodoprotein : some sources of serious error.
Endocrinology 1964, 75, 776-786.
- 18 - TAUROG T., CHAIKOFF L.L.
The determination of thyroxine in the thyroid gland of the rat.
J. Biol. Chem. 1946, 163, 323-328.
- 19 - TAUROG A., POTTER G.D., CHAIKOFF L.L.
Conversion of inorganic I^{131} to organic I^{131} by cell-free Preparations of thyroid tissue.
J. Biol. Chem. 1955, 213, 119-134.

- 20 - TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L.
The monoiodotyrosine content of the thyroïd gland.
J. Biol. Chem. 1950, 184, 83-104.
- 21 - TONG W., CHAIKOFF I.L.
Hydrolysis of ^{131}I -thyroprotein by pancreatin enzymes.
J. Biol. Chem. 1958, 232, 939-950.
- 22 - TONG W., RAGHUPATHY E., CHAIKOFF I.L.
Recovery of thyroxine from thyroïd protein hydrolyse with pancreatic and bacterial proteases.
Endocrinology 1964, 75, 776-786.
- 23 - UI N., TARUTANI O.
Purification of hog thyroglobulin.
J. Biochem. 1961, 50, 508-518.
- 24 - VERNAY M.J.
Etude des protéines extraites de tissus thyroïdiens normaux et pathologiques marquées à l'iode ^{131}I .
Thèse Doct. Pharmacie Lyon 1968.

° °
°

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre I

DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

1. PREPARATION DE L'EXTRAIT GLANDULAIRE.

La composition du solvant d'extraction des protéines thyroïdiennes est la suivante :

- Tris hydroxy méthyl aminométhane 3,63 g (soit 0,03 M)
- Chlorure de sodium 6,43 g (soit 0,11 M)
- Eau distillée Q.S.P. 1 litre.

Le pH est amené à 7 par de l'acide chlorhydrique 2 M.

Les fragments de thyroïde prélevés sont débarassés des tissus adjacents, congelés à -60° C grâce à un mélange réfrigérant acétone-neige carbonique, et découpés à la main, au scalpel ou au rasoir, en tranches de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Celles-ci sont mises en suspension dans le solvant d'extraction (3 ml par gramme de tissu) au réfrigérateur pendant 24 heures. L'élimination du tissu thyroïdien est ensuite faite par centrifugation (30 minutes à 6 000 tours/minute).

On peut calculer le pourcentage d'iode radioactif extrait. Ce pourcentage correspond au taux d'extraction. Cette mesure s'effectue sur une partie aliquote du tissu placée dans un tube du passeur automatique d'échantillons.

Le pourcentage d'iode radioactif extrait a été calculé pour tous les tissus traités.

Pour certaines glandes, nous avons évalué ce taux d'extraction en iode stable. Pour cela, le culot de centrifugation renfermant les fragments de tissu, est dissous dans de la soude normale en chauffant légèrement (on peut réaliser cette opération au bain-marie à 37° C). La solution ainsi obtenue peut être passée directement à l'autoanalyseur pour le dosage de l'iode. En dosant l'iode 127 de l'extrait surnageant, on connaît le rendement d'extraction en iode stable.

2. HYDROLYSE DE L'EXTRAIT.

Les solutions employées sont les suivantes :

<u>Solution tampon</u> :	Tris hydroxy méthyl aminométhane	0,363 g
	Chlorure de sodium	0,643 g
	Sulfate de manganèse	0,0664 g
	Méthylmercaptoimidazol (MMI)	1,254 g
	Eau distillée	Q.S.P. 100 ml

Suspension de viokase : à 10 %

(poids/volume)

Viokase 1 g.
Eau distillée Q.S.P. 10 ml.

5 parties de l'extrait sont diluées avec 5 parties de solution tampon. Le pH est ajusté à 8,5 et on ajoute alors une partie de suspension de viokase (ce qui ne modifie pas sensiblement le pH) et une goutte de toluène. On agite et on laisse le mélange 20 heures à 37° C. Après cette digestion, l'hydrolysate est fortement agité et 2 ml en sont prélevés pour la séparation des composants.

Remarque : Dans ces conditions, la concentration finale de MMI est de 0,05 M et celle du sulfate de manganèse de 0,002 M.

3. SEPARATION DES COMPOSES IODES DE L'EXTRAIT.

3 - 1 Par chromatographie sur gel de séphadex G₂₅.

30 grammes de séphadex G₂₅ "fine" sont laissés en contact au moins 24 heures avec 100 à 150 ml de tampon tris-HCl 0,05 M pH 7,4 dans une fiole à vide. Après gonflement, on élimine par décantation les grains les plus fins qui surnagent et on répète l'opération 2 ou 3 fois. On "dégaze" cette suspension sous vide pendant 30 minutes.

Nous avons utilisé une colonne de verre "Pharmacia" K 1,5/90, fermée dans sa partie inférieure par un disque de nylon. On remplit cette colonne de tampon tris-HCl utilisé pour l'élution. On place au dessus de la colonne un entonnoir suffisamment grand pour contenir tout le gel.

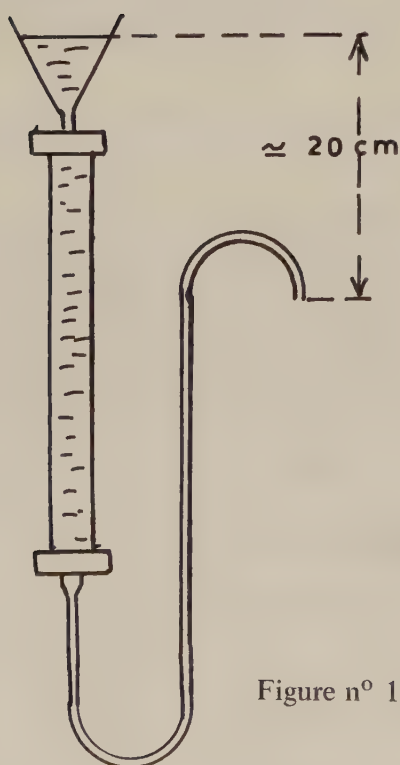


Figure n° 1

On branche sur l'orifice de sortie un tube capillaire d'une longueur à peu près égale à celle de la colonne, dont l'extrémité est amenée de telle façon que la différence de niveau avec la surface du gel soit d'environ 20 cm (Fig. 1). Il est à noter que pour le séphadex G₂₅, la pression de travail n'a pas une grande importance, et le remplissage des colonnes ne présente pas de grosses difficultés. Le tube est fermé. On introduit alors le gel, homogénéisé, dans l'entonnoir et on ouvre le tube de sortie pour permettre un écoulement lent du liquide. Le gel est agité doucement pendant toute l'opération. Lorsque la colonne est confectionnée, c'est-à-dire quand le liquide surnageant est limpide, on place une rondelle de papier filtre à la surface du gel et on passe du tampon pendant environ 30 minutes pour bien équilibrer la colonne.

La hauteur de gel est d'environ 85 cm (correspondant aux 30 grammes de séphadex).

On détermine le volume d'exclusion de la colonne avec un colorant, le bleu dextran 2 000, dont les molécules très volumineuses ($M. = 2 \times 10^6$) ne peuvent pénétrer dans les grains de gel.

Compte tenu du comportement des acides aminés iodés vis à vis du séphadex et du dosage de l'iode stable de ces composés, nous avons utilisé les tampons préconisés par Lissitzky et coll. (4,5). Le tampon tris-HCl 0,05 M, pH = 7,4, permet d'éluer successivement l'iode protéique et l'iodure. Ce tampon n'élue pas les thyronines qui sont fortement adsorbées sur le gel. On emploie alors un solvant organique, l'amylool tertiaire saturé d'ammoniaque 2 M (on prend la partie surnageante d'un mélange à parties égales d'amylool tertiaire et d'ammoniaque 2 M), qui désorbe ces hormones. Le dosage de l'iode ne peut être pratiqué directement sur ce solvant et l'on est dans l'obligation d'extraire T_3 et T_4 de l'amylool par l'ammoniaque 2 M.

Pour l'analyse des échantillons biologiques, on laisse s'écouler complètement le tampon surnageant le gel, puis on dépose l'échantillon lentement, à l'aide d'une pipette Pasteur, en le faisant écouler si possible le long de la paroi de la colonne. On laisse passer l'échantillon dans le gel, on rince avec 2 ou 3 ml de tampon tris-HCl, et on place alors sur la colonne une ampoule à décantation contenant le tampon et formant un joint hermétique avec la colonne, le débit étant assuré par une pompe péristaltique (pompe "Desaga"). Le débit utilisé est de 20 ml par heure.

Après avoir recueilli 150 fractions de 2 ml (ce qui correspond largement à l'élution des polypeptides non hydrolysés, de l'iodure et des iodotyrosines), on laisse s'écouler le tampon surnageant le gel et on le remplace par l'amylool-ammoniacal. Celui-ci libère les iodothyronines qui apparaissent en bloc dans un nombre réduit de fractions.

On extrait ensuite les hormones de ce solvant organique par l'ammoniaque. Pour cela on ajoute aux tubes contenant l'amylool-ammoniacal, une quantité égale d'ammoniaque 2 M. On agite plusieurs fois (4 en général), et on centrifuge. On pipette la couche inférieure ammoniacale de chacun des tubes.

L'extrait ammoniacal obtenu à partir des différents tubes sont réunis et représentent la fraction des iodothyronines.

Le taux d'extraction est calculé grâce à la radioactivité des composés. Il sert à corriger le taux d'iode stable relatif à $T_3 + T_4$.

Nous avons effectué des essais d'extraction en ajoutant à 25 ml d'amylool-ammoniacal, 10 mm³ d'une solution de thyroxine marquée à l'iode 125. On répartit 2 ml de cette solution dans 10 tubes. On mesure la radioactivité puis on ajoute 2 ml d'ammoniaque 2 M dans chacun d'eux. Après agitation et centrifugation, les surnageants sont répartis dans 10 autres tubes et la radioactivité est mesurée. Les résultats sont rassemblés ci-après :

Tableau n° I : Pourcentage d'extraction de la thyroxine de la phase organique par l'ammoniaque 2 M.			
n° des tubes	% d'extraction	n° des tubes	% d'extraction
1	80,0	6	80,3
2	80,8	7	79,4
3	82,2	8	75,8
4	81,1	9	75,8
5	80,0	10	78,7
Pourcentage d'extraction moyen : 79,4 %			

3 - 2 Par chromatographie sur papier.

Nous avons utilisé les systèmes de solvants décrits ci-dessous :

- Solvant acide : . Butanol)
. Acide acétique 2 M) parties égales.

Après agitation, on obtient 2 phases : la phase supérieure constitue la phase mobile, sa dilution au 1/10 dans l'eau : la phase stationnaire.

- Solvant alcalin : . n. Butanol - 4 parties.
. Dioxanne - 1 partie.
. Ammoniaque 2 M - 5 parties.

On agite. La phase supérieure constitue la phase mobile, la phase inférieure correspondant à la phase stationnaire.

La solution à analyser est déposée sur une largeur comprise entre 1,5 et 2 cm sur du papier Whatman 3 MM. On ajoute des entraîneurs non radioactifs à raison de 100 µg, qui servent en même temps de témoins de révélation.

Les dépôts sont faits le plus rapidement possible pour éviter les risques de désiodation et le chromatogramme est aussitôt mis à saturer dans la cuve (environ 3 heures). La phase mobile est ensuite ajoutée et la durée de migration est de 12 à 14 heures.

Après séchage à l'air, on procède à la révélation soit par le chlorure de palladium pour l'iodure et la ninhydrine pour les acides aminés iodés, soit par la réaction sulfate cérique-anhydride arsénieux (1).

4. DETECTION ET DOSAGE DE L'IODE STABLE.

4 - 1 Détection.

Pour la révélation de l'iode des composés iodés stables et des témoins séparés par chromatographie sur papier, nous utilisons deux types de réaction :

- La détection de l'iodure libre est réalisée par pulvérisation d'une solution à 1 % de chlorure de palladium. En présence d'iodure, nous obtenons une coloration marron due à l'iodure de palladium formé. Cette réaction permet de détecter des quantités de l'ordre de 1 à 5 μg d'iodure.
- La réaction de Bowden-Mac Lagan-Wilkinson (1) basée sur l'action catalytique de l'iode sur la réduction des ions cériques par l'anhydride arsénieux permet de révéler tous les composés iodés y compris l'iodure libre.

Le protocole est le suivant :

La bande chromatographique est disposée sur une feuille de papier filtre, elle-même placée sur une plaque de verre. Les solutions d'arsénite et de sulfate cérique sont mélangées à parties égales dans un récipient. Une bande de papier filtre, de mêmes dimensions que la bande chromatographique, est trempée dans ce mélange puis appliquée sur cette dernière. Une seconde plaque de verre est placée sur l'ensemble et permet d'imprimer une compression.

On voit alors se détacher sur le fond jaune des zones décolorées qui correspondent aux composés iodés.

Cette réaction est très sensible et permet de détecter des quantités de 0,01 μg d'iodure de potassium et 0,1 μg de thyroxine.

4 - 2 Dosage.

L'iode contenu dans les fractions recueillies après chromatographie sur colonne se trouve, pour la plus grande partie, sous forme organique. Il s'avère donc nécessaire de minéraliser. L'iode minéral ainsi obtenu possède la même activité catalytique sur la réaction d'oxydo-réduction quel que soit le composé organique de départ.

L'autoanalyseur Technicon que nous utilisons réalise automatiquement les deux phases du dosage, minéralisation et réaction colorée.

Les quantités d'iode dosées étant infimes et les risques de contamination nombreux, l'emploi d'un tel appareil automatique permet la pratique de nombreux dosages de manière précise, rapide et reproductible.

La minéralisation est une minéralisation acide avec le mélange acide perchlorique-acide nitrique-acide sulfurique. Elle se réa-

lise dans un "minéralisateur", formé d'une hélice en pyrex tournant sur elle-même et chauffée par des résistances électriques. Le mouvement de l'hélice fait progresser le liquide à minéraliser qui est ensuite prélevé à la sortie de manière continue. Le temps de minéralisation est très court (3 minutes) à la température de 350° C.

La rapidité de la minéralisation s'explique par une répartition du liquide en couche mince sur une grande surface.

La détermination de l'iode minéral (6) se fait sur un aliquot de minéralisat prélevé à la sortie du minéralisateur. La réduction du sulfate cérique par l'anhydride arsénieux en présence d'iode minéral s'effectue au bain-marie à 55° pendant 8 minutes ; le mélange est ensuite photométré à 420 nanomètres. Etant donné l'aspect cinétique de la réaction catalytique, il est bien entendu nécessaire de photométrer les échantillons à des temps identiques après la mise en contact de l'iode avec les réactifs, ce qui est parfaitement réalisé dans l'autoanalyseur. Pour chaque série de dosages, des étalons d'iodate de potassium en solution aqueuse sont dosés et l'on trace la courbe des transmissions en fonction des concentrations (Fig. 2 et 3).

Les dosages d'effectuent à un rythme de 20 échantillons à l'heure. Cette technique permet de doser l'iode à des concentrations de l'ordre de 1/100 de µg/ml.

Le schéma de montage de l'appareil et les débits de chaque réactif sont indiqués dans la figure n° 4.

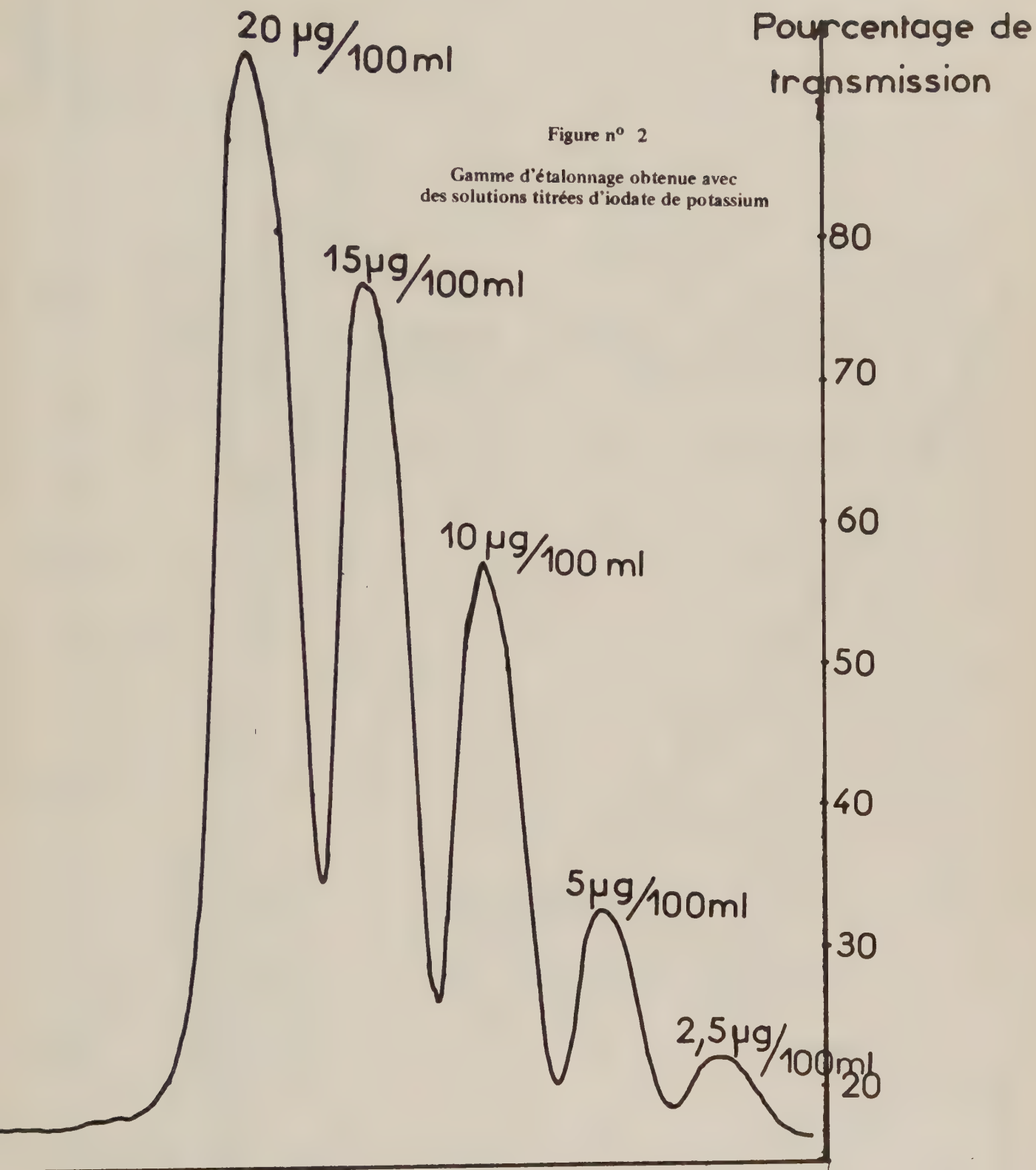
Réactifs.

1°) Réactifs de minéralisation :

- Acide sulfurique concentré d = 1,84 (pro analysis Merck).
- Mélange préparé extemporanément comprenant :
 - . Acide perchlorique concentré d = 1,67 : 4 parties
(pro analysis Merck)
 - . Acide nitrique concentré d = 1,40 : 1 partie
(pro analysis Merck).

2°) Réactifs pour la réaction colorée :

- Solution de sulfate cérique ammoniacal :
 - . Sulfate cérique ammoniacal (Merck)
 $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$ 6,3 g
- Solution d'anhydride arsénieux :
 - . Anhydride arsénieux (Merck) 1,96 g
 - . Soude en pastilles 1,40 g
 - . Acide sulfurique concentré (d = 1,84) -
 - . Chlorure de sodium 25,00 g
 - . Eau permutée Q.S. 1 000 ml



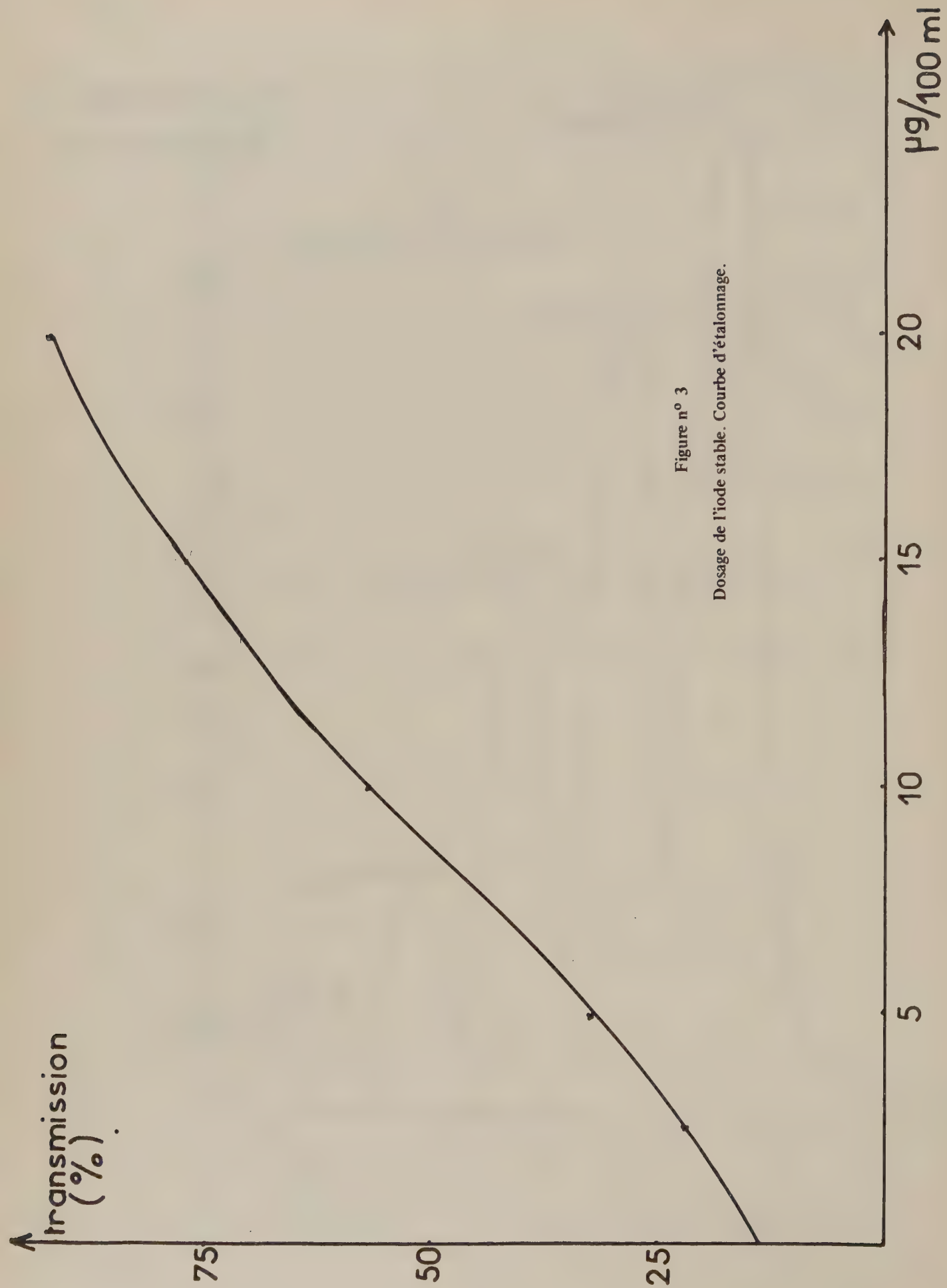


Figure n° 3

Dosage de l'iode stable. Courbe d'étalonnage.

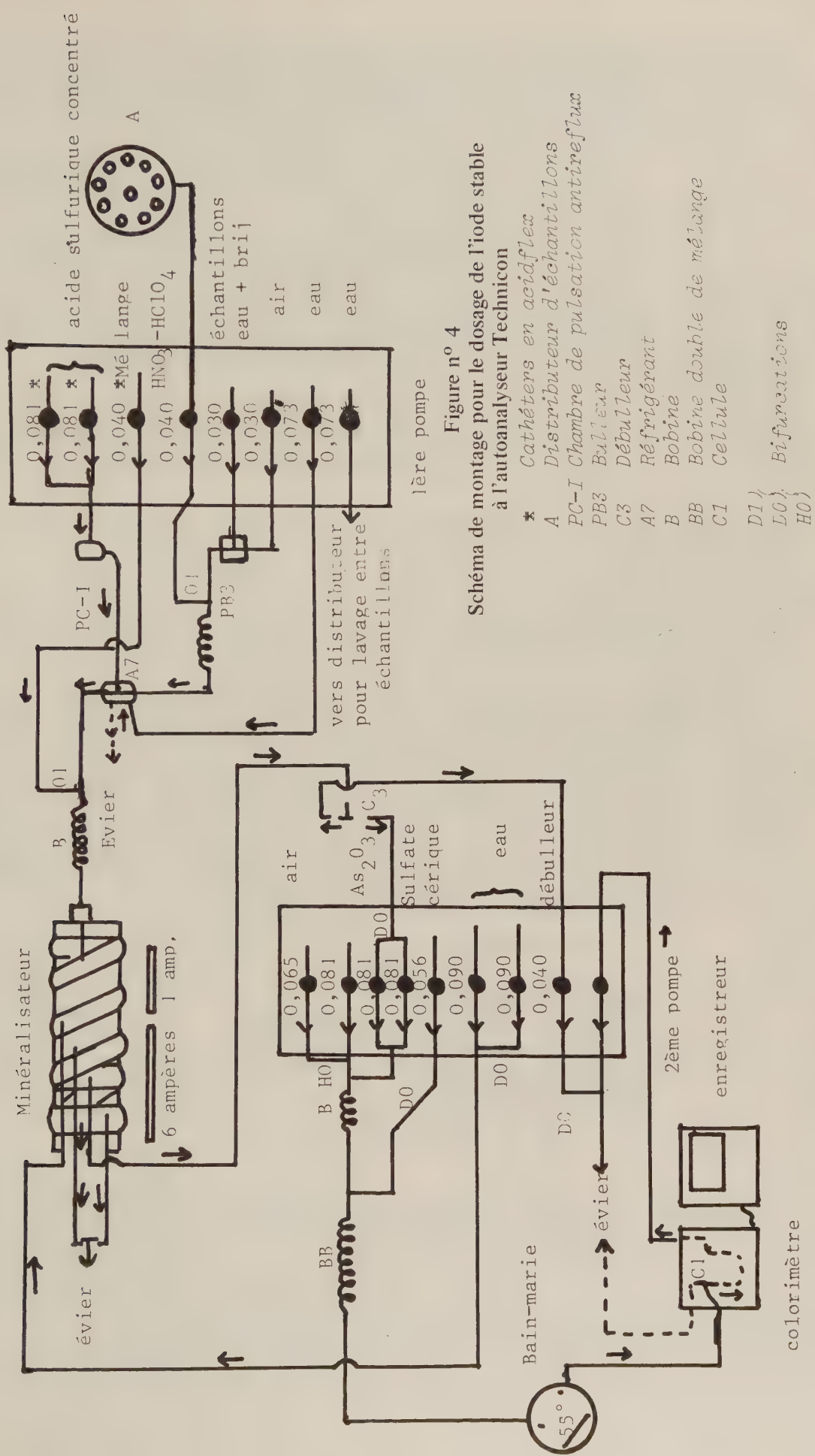


Figure n° 4
Schéma de montage pour le dosage de l'iode stable à l'autoanalyseur Technicon

- * Cathéters en acidflex
- A Distributeur d'échantillons
- PC-I Chambre de pulsation antireflux
- PB3 Bulleur
- C3 Débulleur
- A7 Réfrigérant
- B Bobine
- BB Bobine double de mélange
- C1 Cellule
- D1 Bifurcations
- L0 Bifurcations
- H0 Bifurcations

Dissoudre 1'anhydride arsénieux et la soude dans environ 100 ml avec de l'eau permutée. Ajouter quelques gouttes de phénolphthaléine puis de l'acide sulfurique jusqu'à décoloration.

Ajouter de l'eau jusqu'à environ 750 ml. Verser le chlorure de sodium. Agiter jusqu'à dissolution et compléter à 1 litre avec de l'eau permutée.

Le chlorure de sodium présent dans ce réactif augmente la vitesse de réaction et permet d'avoir une réaction du 1er ordre par rapport au sulfate cérique quelle que soit la concentration de l'anhydride arsénieux. D'autre part, son activité catalytique propre sur la réaction est très faible (10^6 fois plus faible que celle de l'iode) (2).

- Les solutions étalons d'iodate de potassium à 5, 10, 15, 20 et $25\mu\text{g}/100\text{ ml}$ d'iode sont préparées par dilutions successives à partir d'une solution mère renfermant $100\mu\text{g}/\text{ml}$ d'iode.

5. DOSAGE DE L'IODE RADIOACTIF.

5 - 1 Chromatogrammes sur papier.

L'étude de la répartition de la radioactivité des chromatogrammes sur papier est réalisée de deux façons :

- Soit à l'aide d'un ensemble de détection (Fig. n° 5) comprenant deux cristaux d'iodure de sodium équipés d'une fenêtre de protection en béryllium reliés à une électronique de type classique (3). La bande du chromatogramme défile à vitesse constante, réglable, entre deux fenêtres de 3 mm de largeur placées en regard l'une de l'autre, et derrière lesquelles se trouvent les scintillateurs. Ces fentes sont pratiquées dans des plaques de cuivre de 1,2 mm d'épaisseur, largement suffisante pour assurer une bonne collimation des photons émis par l'iode 125.

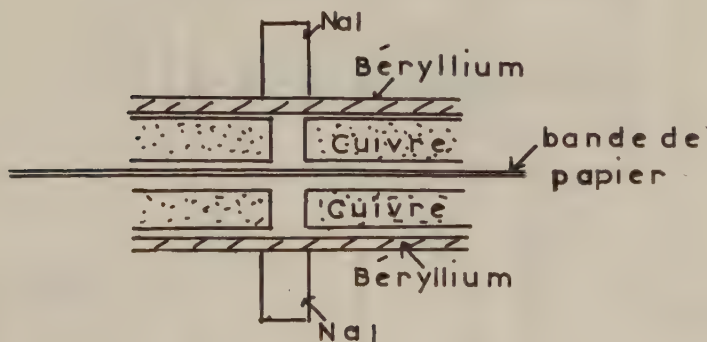


Figure n° 5 : Ensemble de mesure de l'iode 125 sur les bandes de chromatogrammes.

Cet équipement ne peut être utilisé que pour l'iode 125 et le rendement obtenu pour cet isotope est de 35,7 % avec un mouvement propre de 14,8 impulsions par minute en moyenne.

L'activité en fonction de la longueur du chromatogramme est directement enregistrée et on peut apprécier la valeur de chaque pic par planimétrie.

- Soit en découpant le chromatogramme en sections de 3 mm, mesu-

rées dans le compteur à cristal creux. Dans ce cas, on porte sur papier millimétré, le diagramme de la radioactivité en fonction de la longueur du chromatogramme. Cette méthode est valable quelque soit l'isotope utilisé, iode 131 ou iode 125.

5 - 2 Eluat.

Pour mesurer l'activité de l'éluat sortant de la colonne nous utilisons également deux procédés :

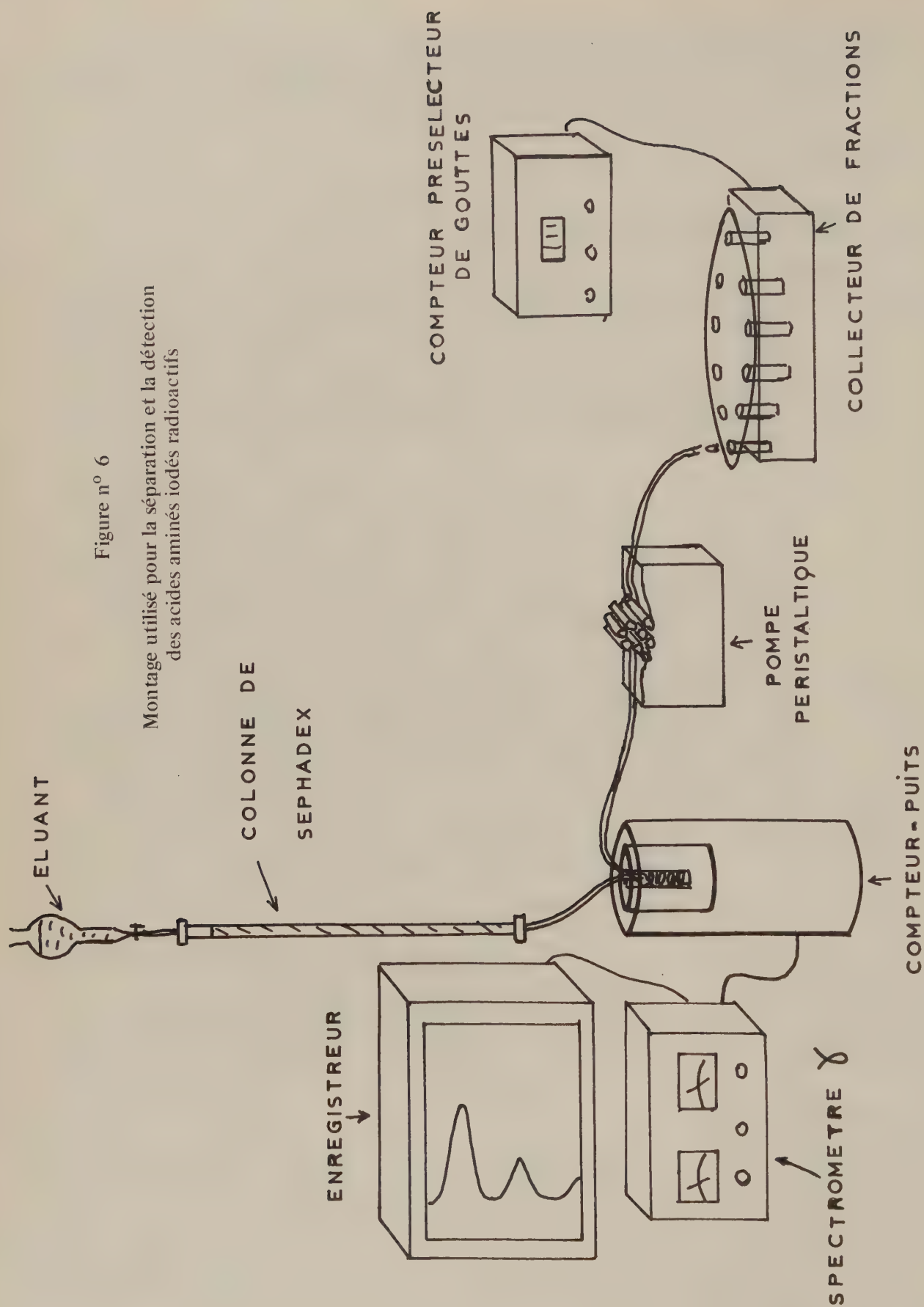
- 1°) A la sortie de la colonne, l'éluat passe dans un serpentin (de volume égal à 1 ml) placé dans le puits d'un cristal creux d'iodure de sodium activé au thallium, relié à un spectromètre et à un enregistreur (Fig. n° 6). Ce dispositif permet de visualiser rapidement les pics de radioactivité et d'évaluer le pourcentage de chacun d'eux par planimétrie de l'enregistrement obtenu. Nous avons utilisé ce procédé pour l'iode 125, surtout dans le but de vérifier la bonne élution des composés.
- 2°) L'éluat est distribué, grâce à un collecteur de fractions, en fractions de 2 ml. Ces fractions recueillies sont alors comptées dans un compteur à scintillations (passeur automatique d'échantillons "Nuclear Chicago") à cristal creux d'iodure de sodium activé au thallium. Cet appareil est équipé d'un spectromètre gamma, permettant de discriminer les deux isotopes de l'iode (iode 125 et iode 131) lorsqu'ils sont présents dans la même glande. Cependant la figure n° 7 montre que les spectres de l'iode 125 et 131 se recouvrent en partie, et qu'il est impossible de compter l'iode 125 sans que l'iode 131 interfère. Le tableau n° II résume les résultats des comptages obtenus avec des solutions d'iode 125 et d'iode 131 seules ou mélangées, dans les conditions de réglage précisées.

(<u>Tableau n° II</u> : Résultats des comptages de solutions d'iode 125 et)			
(: d'iode 131 obtenus sur chacun des pics A et A')			
(: d'absorption totale de ces radioéléments.)			
(: Taux de comptage en impulsions par minute.)			
(: (bruit de fond déduit).)			
(:)			
(Solutions : Iode 125 : Iode 131.)			
(comptées. : Fenêtre 10-45 KeV : Fenêtre 320-415 KeV)			
(:)			
(I μ Ci $^{125}_{1}$: 780 300 : 0)			
(I μ Ci $^{131}_{1}$: 49 630 : 886 200)			
(x μ Ci $^{125}_{1}$ + } : : :)			
(y μ Ci $^{131}_{1}$ - } : $T_1 = (x.780\ 300) + (y.49630)$: $T_2 = y. 886\ 200$)			
(: : :)			

Des deux dernières équations du tableau II, on peut tirer les valeurs de x et de y en fonction des taux de comptage obtenus T_1 et T_2 .

Figure n° 6

Montage utilisé pour la séparation et la détection
des acides aminés iodés radioactifs



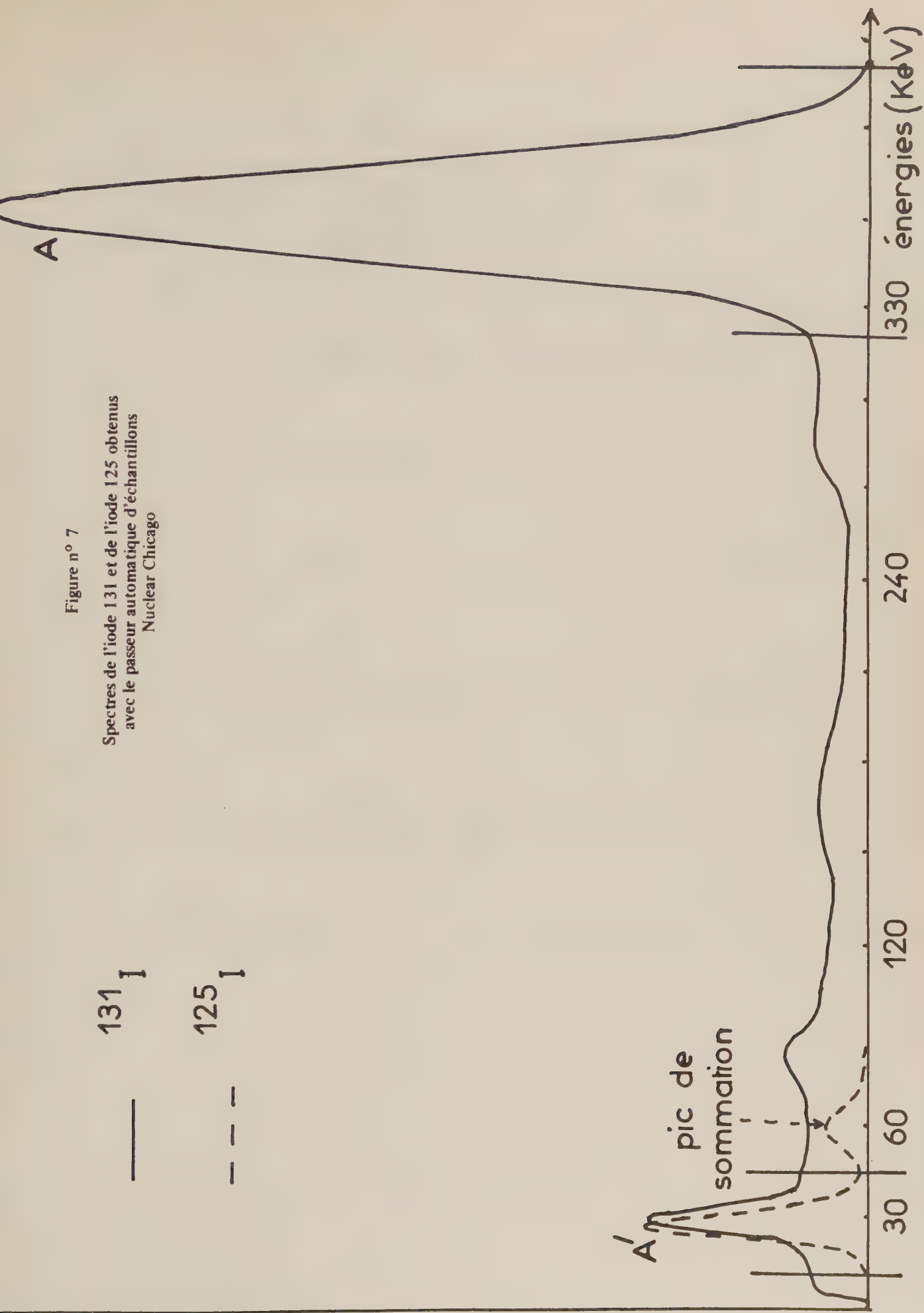
$\frac{dn}{dE}$

^{131}I

^{125}I

Figure n° 7

Spectres de l'iode 131 et de l'iode 125 obtenus
avec le passeur automatique d'échantillons
Nuclear Chicago



Dans la pratique, on voit que $\frac{49}{886} - \frac{630}{200}$, soit 5,6 % du taux de comptage de l'iode 131 obtenu sur le pic d'absorption totale de l'iode 131 sont retrouvés sur le pic de l'iode 125. Lorsque les deux isotopes sont présents dans la même solution il suffit donc, pour connaître l'activité due à l'iode 125 seul, de soustraire du taux de comptage trouvé sur le pic de l'iode 125, les 5,6 % du taux de comptage trouvé dans la voie de l'iode 131. On a :

$$\begin{array}{l} \text{activité de l'iode 125} \\ \text{(en impulsions par minute)} \end{array} = T_1 - \frac{5,6}{100} \times T_2$$

° °
°

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BOWDEN C.H., MAC LAGAN N.F., WILKINSON J.H.
The application of the ceric sulphate arsenious acid reaction to the detection of thyroxin and related substances.
Biochem. J. 1955, 59, 93-97.
- 2 - DAUDIN-CLAVAUD P.
A propos du dosage de l'iode protidique sanguin.
Rôle du chlore extracatalyseur.
Ann. Biol. Clin. 1964, 22, 365-371.
- 3 - ESPINASSE P.
Un compteur de bande de chromatographie ou d'électrophorèse spécial pour l'iode 125.
J. Biol. Med. Nucl. de l'ATEN. 1963, Tome III, n° 13, 25-27.
- 4 - LISSITZKY S., BISMUTH J.
Détermination quantitative de la composition des sérum en ^{131}I -thyroxine et ^{131}I -triiodothyronine par filtration sur gel de dextran (séphadex).
Clin. Chim. Acta. 1963, 8, 269-276.
- 5 - LISSITZKY S., BISMUTH J., ROLLAND M.
Séparation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextran (séphadex).
Clin. Chim. Acta. 1962, 7, 183-189.
- 6 - SANDELL E.B., KOLTHOFF I.M.
Microdetermination of iodine by a catalytic method.
Mikrochim. Acta. 1937, 1, 9-25.

° °
°

Chapitre II

ESSAIS ET CONTROLE DES TECHNIQUES UTILISEES

Nous décrivons dans ce chapitre les essais pratiqués pour s'assurer de la validité des différentes techniques choisies. Ces essais ont tout d'abord été réalisés sur des solutions pures d'iodure et d'acides aminés iodés, puis sur les extraits et les hydrolysats thyroïdiens.

Avant d'aborder les résultats, il est nécessaire d'étudier les problèmes qui se posent au niveau de la préparation et de la conservation des solutions de composés iodés. Ceux-ci sont en effet d'une importance capitale pour les résultats, et on les retrouve dans le choix des éluants pour la séparation chromatographique de ces composés iodés.

1. PREPARATION ET CONTROLE DES SOLUTIONS IODEES.

Le caractère hydrophobe des cycles aromatiques des acides aminés iodés les rend assez peu solubles dans les solutions aqueuses, surtout les iodothyronines, sauf aux pH suffisamment élevés où l'ionisation de la fonction phénol permet la solubilisation. L'ammoniaque ou la soude, n'interférant pas dans le dosage ultérieur de l'iode, sont en général utilisées pour atteindre les pH optimaux.

En solution, les composés iodés se conservent mal et ont tendance à se désioder, surtout en milieu alcalin. Il est préférable de les conserver à basse température, entre 0° et 5°, et à l'abri de la lumière.

Le problème de l'adsorption sur les récipients a été étudié, en particulier par Lissitzky et coll. (5). Ils ont montré que cette adsorption est pratiquement nulle pour l'iodure et les iodotyrosines en solution, alors que la thyroxine est fortement fixée. Cette fixation dépend de la concentration de la solution et de son pH ; elle est maximum pour les pH élevés (pH 9), ce qui, nous le verrons plus loin, s'avère intéressant pour le choix des solvants. Imarisio et Greco (2) ont également montré l'influence du pH et de la force ionique des tampons sur l'adsorption de T₃ et T₄ par le verre. Kennedy (4), en utilisant de l'iode radioactif, a étudié l'influence de la nature des récipients. Il a montré que l'adsorption de la T₄ sur le verre pyrex (environ 10 % en 24 heures) était nettement inférieure à son adsorption sur des récipients en polyéthylène (de l'ordre de 50 %). Par contre, cette adsorption est pratiquement annulée si les solutions contiennent de la sérum-albumine qui fixe plus fortement la T₄ que la matière constituante du récipient.

Ce problème, posé au stade de la conservation, se retrouve lors du dosage automatique à l'autoanalyseur, où la substance à doser, stockée au départ dans un godet de plastique, est ensuite prélevée et

conduite par un jeu de cathéters en chlorure de polyvinyle jusqu'au terme de la réaction. Ce phénomène peut conduire à des valeurs trouvées inférieures de moitié aux valeurs théoriques pour T₃, T₄ et l'iodure de potassium (3).

Préparation des solutions :

Les phénomènes cités auparavant, l'emploi pour la séparation sur gel de dextrane de tampon tris-HCl 0,05 M pH = 7,4 et d'ammoniaque 2 M, les résultats satisfaisants obtenus avec ces éluants par Jones et Schultz (3) pour le dosage de l'iode, nous ont conduit à utiliser des solutions d'iodure de potassium, MIT, DIT dans le tampon tris-HCl 0,05 M pH = 7,4 et de T₃ et T₄ dans l'ammoniaque 2 M. Toutes ces solutions sont préparées dans des récipients en verre pyrex et utilisées le plus rapidement possible.

Nous avons préparé des solutions mères renfermant 40 ou 50 mg d'iode pour 100 ml. L'iodure de potassium est dissous directement dans le tampon tris-HCl. T₃ et T₄ sont mises en solution dans l'ammoniaque 2 M. Ces solutions mères sont ensuite diluées au 1/50 puis au 1/100 dans leurs solvants respectifs. On arrive ainsi à des solutions renfermant 8 ou 10 µg d'iode pour 100 ml.

Précision du dosage :

Chacune des solutions est répartie en 10 échantillons dans les godets en plastique de l'appareil et immédiatement dosée. Les tableaux I et II donnent les résultats de 2 expériences ainsi effectuées.

<u>Tableau n° 1</u> : Dosage de l'iode de solutions d'iodure et d'acides aminés iodés (1ère expérience).						
: Résultats en µg d'iode/100 ml						
	: KI	: MIT	: DIT	: T ₃	: T ₄	
Valeurs théoriques	: 8	: 8	: 8	: 8	: 7,20	
	: 7,6	: 7,6	: 8,0	: 6,8	: 6,3	
	: 7,6	: 7,6	: 8,1	: 6,9	: 6,5	
	: 7,7	: 7,6	: 8,2	: 7,1	: 6,5	
	: 7,7	: 7,7	: 8,2	: 7,2	: 6,6	
	: 7,7	: 7,6	: 8,2	: 7,1	: 6,7	
	: 7,8	: 7,6	: 8,2	: 7,2	: 6,7	
	: 7,8	: 7,6	: 8,1	: 7,2	: 6,6	
	: 7,8	: 7,3	: 8,2	: 7,2	: 6,6	
	: 7,7	: 7,5	: 8,2	: 7,2	: 6,7	
	: 7,8	: 7,4	: 8,1	: 7,3	: 6,7	
Moyenne	: 7,72	: 7,55	: 8,15	: 7,12	: 6,59	
Ecart-type	: 0,08	: 0,13	: 0,07	: 0,16	: 0,13	
% retrouvé	: 96,5 %	: 94,3 %	: 101,8 %	: 89,0 %	: 91,5 %	
	: :	: :	: :	: :	: :	
	: :	: :	: :	: :	: :	

Les solvants (tampon tris-HCl et ammoniacque 2 M) ont été analysés. Ils correspondaient à la ligne de base c'est-à-dire ne contenaient pas d'iode décelable.

On voit d'après ce tableau que l'on a une bonne précision dans ce dosage puisque, si l'on prend deux écarts-types de part et d'autre de la moyenne, elle est d'environ 2 % pour iodure et DIT, et 4 % pour MIT, T₃ et T₄. Ceci est confirmé par les résultats du tableau II, encore que la précision soit légèrement meilleure, notamment pour T₄.

Tableau n° II : Dosage de l'iode de solutions d'iodure et d'acides aminés iodés (2ème expérience).						
: Résultats en µg d'iode/100 ml						
	KI	MIT	DIT	T ₄		
Valeurs théoriques	10	10	10	10		
	9,5	9,3	9,5	8,9		
	9,7	9,2	9,5	8,9		
	9,7	9,2	9,5	8,9		
	9,7	9,2	9,4	8,9		
	9,7	9,1	9,6	8,9		
	9,7	9,1	9,5	8,9		
	9,8	9,1	9,5	9,0		
	9,7	9,0	9,5	9,1		
	9,7	9,0	9,5	9,1		
	9,6	8,8	9,4	9,1		
Moyenne	9,68	9,10	9,49	8,97		
Ecart-type	0,08	0,14	0,06	0,09		
% retrouvé	96,8	91	94,9	89,7		

Comme dans la première expérience, les solvants ne contenaient pas d'iode en quantité décelable.

2. RECUPERATION DES COMPOSES IODES INTRODUITS SEPAREMENT SUR COLONNE DE SEPHADEX G25.

2 - 1 Contrôle par dosage de l'iode stable.

Ces expériences ont été faites dans le double but de calculer le rendement en iode stable pour les différents composés iodés après passage sur le gel, et de mettre en évidence la libération éventuelle de substances pouvant interférer dans la réaction catalytique et faussant de ce fait les résultats. De plus, cela nous a

permis de déterminer le volume d'élution de chacun des composés et par suite leur ordre d'apparition dans l'éluat.

Deux millilitres de la solution de chaque composé iodé, contenant 20 µg d'iode 127, sont déposés sur la colonne. On recueille l'effluent en une seule fraction de 200 ml, quantité suffisante pour être certain d'avoir tout élué.

Théoriquement, la concentration de cet effluent est de 10 µg/100 ml. Chaque effluent est dosé en 5 exemplaires, de même que la solution de départ diluée au 1/100 (concentration théorique : 10 µg/100 ml) pour l'iodure de potassium, MIT, T₃ et T₄ ; et au 1/125 pour DIT (concentration : 8 µg/100 ml). Les résultats sont réunis dans le tableau n° III :

Tableau n° III : Dosage de l'iode stable de solutions d'iodure et d'acides aminés iodés après passage sur séphadex G ₂₅ .					
Résultats en µg/100 ml					
	KI	MIT	DIT	T ₄	
Concentration de la solution mesurée avant passage sur colonne (moyenne de 5 dosages)	9,44	9,70	8,10	9,46	
Concentration dans l'éluat (moyenne de 5 dosages)	9,88	9,70	8,25	8,68	
% par rapport à la concentration mesurée.	104,7	100	101,8	91,8	

Pour la T₄, il faut tenir compte de son extraction de l'amylo1-ammoniacal par l'ammoniaque 2 M. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les iodothyronines, fortement adsorbées sur le gel, ne sont éluées de la colonne que par un solvant organique, en l'occurrence l'amylo1 saturé d'ammoniaque 2 M. Le dosage de l'iode n'étant pas réalisable directement sur ce solvant, on en extrait les hormones par l'ammoniaque 2 M. Nous pouvons calculer le pourcentage d'extraction par addition de thyroxine marquée à l'iode 125, en quantité suffisamment faible pour que la concentration en iode stable soit négligeable.

Dans cette expérience, le pourcentage d'extraction a été trouvé égal à 96,6 %. Il s'en suit que le rendement de la colonne pour la thyroxine est, toutes corrections faites, de :

$$\frac{91,8 \times 100}{96,6} = 95,0 \%$$

Du point de vue qualitatif, ces essais nous montrent que l'iodure est le composé dont le volume d'élution est le plus faible, suivi par la MIT puis la DIT, les iodothyronines n'étant pas éluées par le tampon tris-HCl.

2 - 2 Contrôle par mesure de la radioactivité.

Ce passage sur séphadex G₂₅ "fine" nous permet de calculer le rendement pour chacun des composés et de vérifier que les molécules ne s'altèrent pas au cours du passage sur le gel.

Nous nous sommes servis pour cette étude de molécules radioactives, marquées à l'iode 125, synthétisées par "Sorin", et délivrées par le Commissariat à l'énergie atomique de Saclay. Ces solutions sont diluées au 1/5 000 dans les solvants que nous avons décrits auparavant.

Notre travail a consisté à chromatographier sur colonne de séphadex et sur papier (en solvant butanol acétique) ces diverses solutions, à comparer les résultats donnés par ces deux techniques. Ceux-ci figurent dans le tableau n° IV.

<u>Tableau n° IV</u> : Résultats obtenus par chromatographie sur gel de séphadex et chromatographie sur papier des diverses molécules iodées radioactives (Résultats exprimés en % de l'activité totale recueillie).							
		Chromatographie sur séphadex G ₂₅ "fine"		Chromatographie sur papier			
Composé analysé	Rendement : $\frac{\text{act. recueill.}}{\text{act. déposée}} \times 100$	Iodure	Composé	Iodure	Composé	Autre composé	Autre composé
Iodure- ¹²⁵	94,8	100					
MIT- ¹²⁵ ₁	93,7	5,4	94,6	4,7	90,6	4,7 ("x")	
MIT- ¹²⁵ ₁	100,5	5,9	94,1	18,2	71,3	10,5 ("z")	
DIT- ¹²⁵ ₁	90,3	9,0	91,0	8,6	85,2	6,2 ("x")	
Mélange							
(T ₃ +T ₄)- ¹²⁵ ₁	101,5	6,1	93,9	22,1	70,7	7,2 ("y")	

On peut constater que les rendements sur gel de séphadex sont toujours supérieurs à 90 % et les pourcentages d'iode en général inférieurs à ceux obtenus par chromatographie sur papier.

Les taches supplémentaires trouvées par chromatographie sur papier, baptisées :

- Composé "x" de $R_f = 0,50$ situé entre iodure et MIT ;
- Composé "y" de $R_f = 0,70$ situé après MIT ;
- Composé "z" de $R_f = 0,90$ situé un peu avant le front du solvant (cette tache étant d'ailleurs plus étalée),

n'ont pas été identifiées.

Chacun des pics obtenus sur séphadex et correspondant aux composés déposés sur la colonne (MIT, DIT, T_4), ont été chromatographiés sur papier après concentration sous vide ; ces mêmes taches ont été retrouvées. Ceci semble montrer que ce sont des artéfacts dus à la technique de chromatographie sur papier. En effet, il paraît peu vraisemblable que ces substances, si elles préexistent dans la solution déposée, ne soient pas séparées sur séphadex, étant donné leurs R_f , pour certains très différents de celui du composé étudié.

La séparation sur séphadex G_{25} donne donc des résultats satisfaisants ; les molécules ne sont pas altérées par le passage sur le gel de dextrane et les rendements sont très corrects.

3. RECUPERATION DES MELANGES DE COMPOSES IODES INTRODUITS SUR COLONNE DE SEPHADEX G_{25} .

Nous avons testé la séparation d'un mélange des différents composés iodés considérés et la bonne récupération de chacun d'eux.

2 ml d'un mélange renfermant théoriquement 20 μg d'iode sous forme d'iodure de potassium, MIT, DIT, T_4 (5 μg d'iode pour chaque composé) sont préparés et amenés à $\text{pH} = 8,5$ qui correspond au pH des hydrolysats.

Au préalable, les différentes solutions sont dosées à l'autoanalyseur. Les quantités déposées sont de :

- 4,8 μg d'iode pour l'iodure de potassium,
- 4,6 μg d'iode pour MIT,
- 4,7 μg d'iode pour DIT,
- 4,5 μg d'iode pour T_4 ,

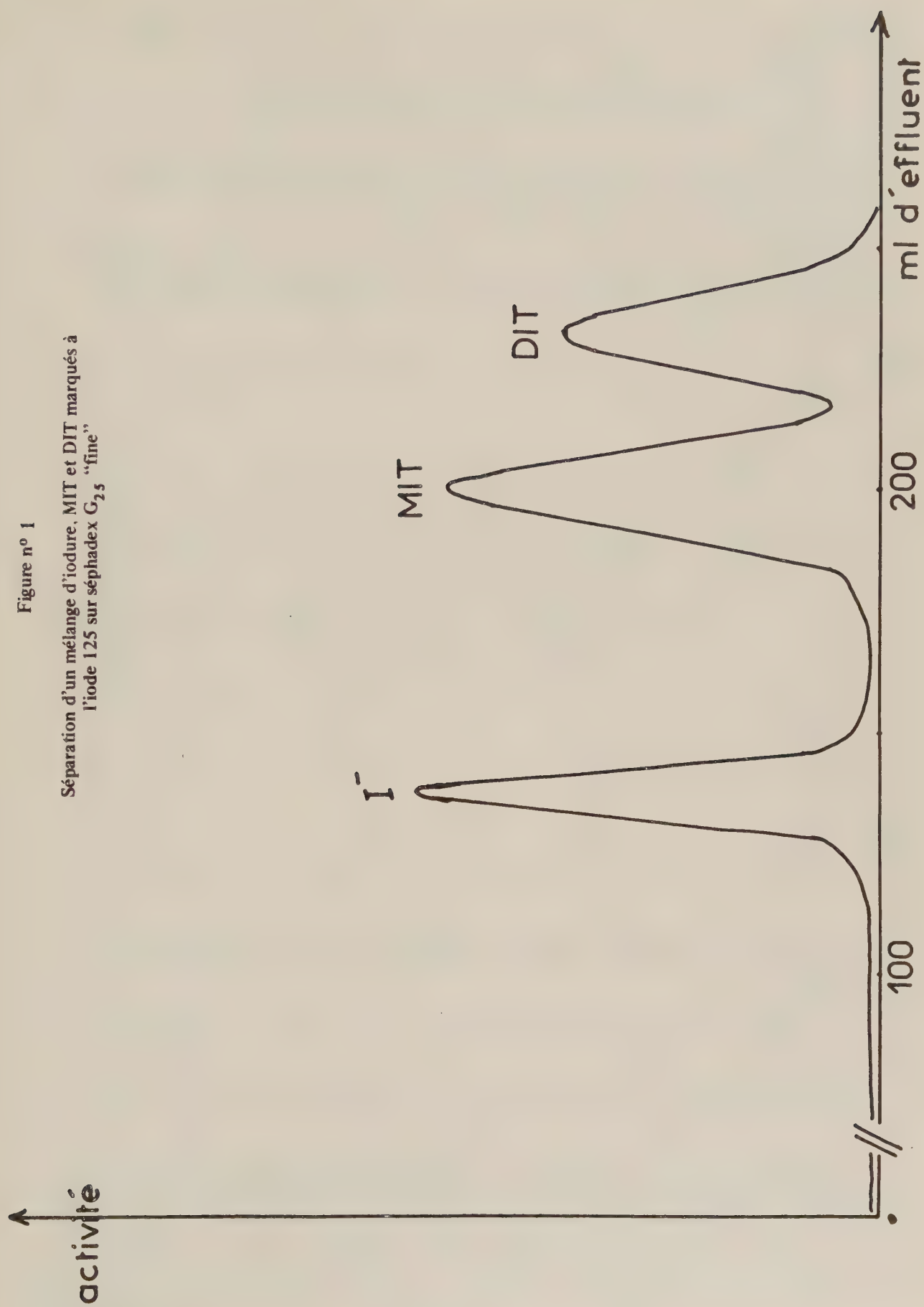
soit au total 18,6 μg .

A ce mélange de 2 ml, on a ajouté des doses traceuses des composés radioactifs correspondants (la quantité d'iode stable ajoutée étant négligeable).

Les fractions de chacun des pics d'iodure, MIT, DIT obtenus après séparation sur séphadex (Figure n° 1) et visualisés par l'enregistrement continu de la radioactivité, sont rassemblées et complétées à 50 ml avec du tampon tris-HCl.

Figure n° 1

Séparation d'un mélange d'iodure, MIT et DIT marqués à l'iode 125 sur séphadex G₂₅ "fine"



Ces solutions sont dosées (en 4 exemplaires). Les résultats sont :

- Iodure : 9,3 µg/100 ml, soit 4,65 µg pour les 50 ml ;
- MIT : 8,2 µg/100 ml, soit 4,10 µg pour les 50 ml ;
- DIT : 9,70µg/100 ml, soit 4,85 µg pour les 50 ml.

D'autre part, les 12 fractions de 2 ml d'amylo1 ammoniacal renfermant la T₄ sont traitées par l'ammoniaque 2 M et le bilan d'extraction calculé par la radioactivité est ici de 89,9 %.

Les surnageants ammoniacaux des 12 tubes sont rassemblés et complétés à 50 ml par l'ammoniaque 2 M. Le dosage de cette solution (en 4 exemplaires) nous a donné le chiffre de 7,4 µg/100 ml, soit 3,7 µg pour les 50 ml.

Compte tenu du pourcentage d'extraction, le taux d'iode correspondant à T₄ est donc de :

$$\frac{3,7 \times 100}{89,9} \text{ soit : } 4,12 \mu\text{g.}$$

Tous les résultats et les rendements sont réunis dans le tableau suivant :

<i>Tableau n° V : Séparation sur séphadex G₂₅ d'un mélange d'acides aminés stables.</i>				
	Quantité déposée	Quantité récupérée	Rendement	
	sur la colonne.	après séparation.		
	(en µg)	(en µg)		(en %)
Iodure	4,8	4,65		96,9
MIT	4,6	4,10		89,1
DIT	4,7	4,85		103,1
T ₄	4,5	4,12		91,6
Mélange	18,6	17,72		95,2

4. SEPARATION DES COMPOSES IODES DE L'EXTRAIT BRUT SUR SEPHADEX G₂₅.

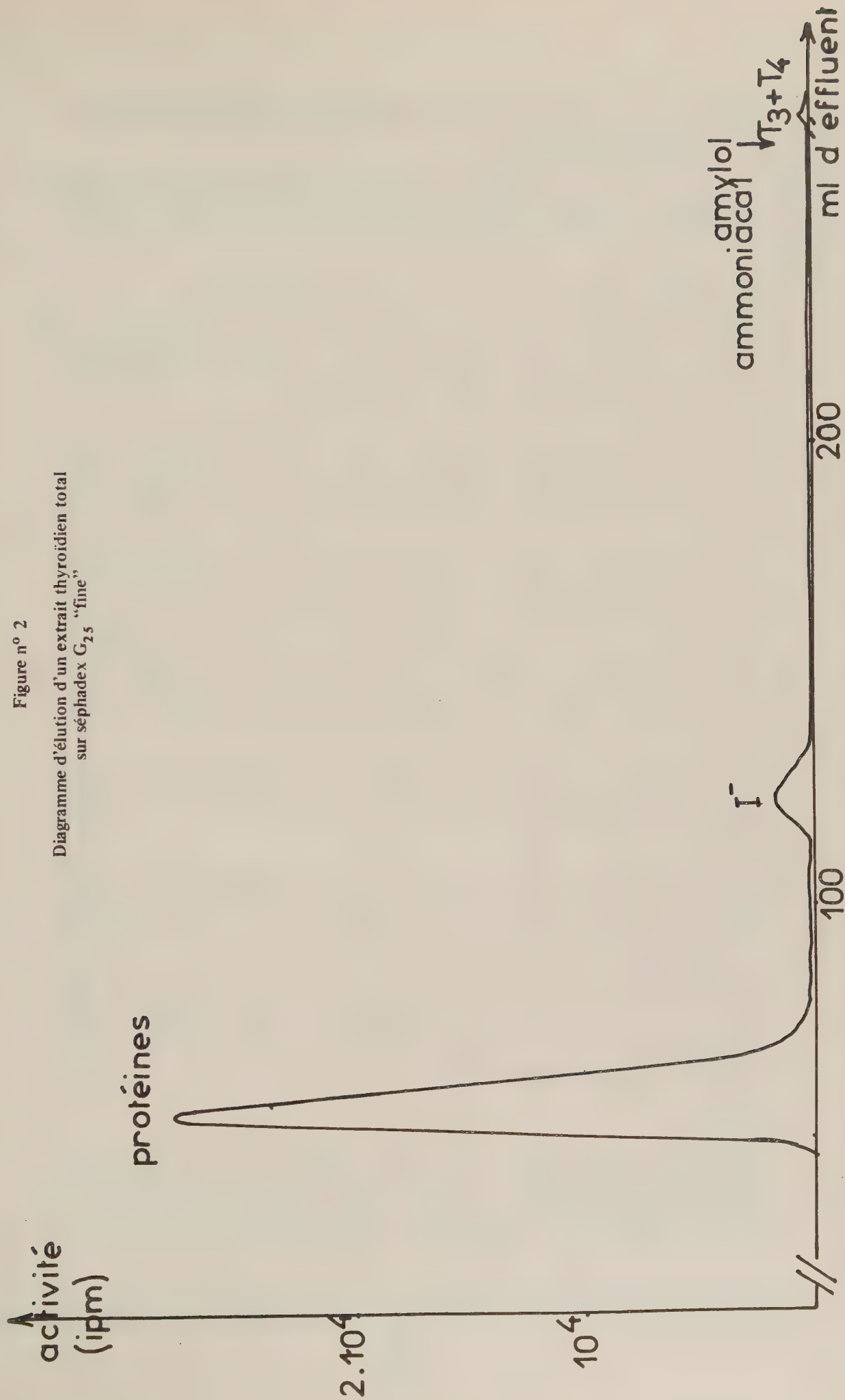
(Figure n° 2)

Ces essais préliminaires terminés, nous avons appliqué la technique au matériel biologique.

Le type de diagramme d'élution obtenu à partir d'extraits non hydrolysés est représenté dans la figure n° 2.

Le premier pic, très important, renferme les protéines iodées et son volume d'élution correspond au volume d'exclusion du gel. Vient ensuite le pic d'iodure. Les pics correspondant aux iodotyrosines quantitativement faibles ne sont pratiquement jamais visibles, de même que le pic des iodothyronines éluées par l'amylo1.

Figure n° 2
 Diagramme d'élution d'un extrait thyroïdien total
 sur séphadex G₂₅ "fine"



5. SEPARATION DES COMPOSES IODES DE L'EXTRAIT HYDROLYSE (Figure n° 3).

5 - 1 Pic de polypeptides (PP).

On observe pour le volume d'exclusion un pic (PP) qui correspond au matériel protéique non hydrolysé par la voie enzymatique employée.

5 - 2 Le problème des trois pics de la région des iodures.

Dans la région de l'iodure nous obtenons 3 pics baptisés II_a , II_b , II_c , d'importance inégale. Le pic central (II_b) est généralement le plus important. Nous avons essayé de déterminer la nature des composés renfermés dans ces différents pics.

Dans un premier temps, les fractions correspondant à chacun de ces 3 pics sont rassemblées, évaporées sous vide à température inférieure à 40° C, puis le résidu soumis à une chromatographie sur papier en solvant BAC et BDA. La radioactivité trop faible de ces composés ne nous a pas permis de les identifier.

Nous avons alors utilisé un hydrolysats de tissu adénomateux dont la séparation sur gel de séphadex et le dosage de l'iode 127 de chaque fraction montrait un pic II_b riche en iode stable. Après évaporation de l'éluat correspondant à ce pic et chromatographie sur papier, la révélation par la réaction sulfate cérrique-anhydride arsénieux nous a permis de mettre en évidence une tache de décoloration très nette, située au niveau de l'iodure témoin. Le pic II_b est donc très vraisemblablement constitué par des ions iodure.

De plus, la séparation d'hydrolysats sur colonne de séphadex G10 (cf. § suivant 5 - 3) nous a montré que la fraction iode isolée sur ce gel correspondait quantitativement en iode stable à la fraction II_b .

Enfin, nous avons déterminé, pour certains hydrolysats, le pourcentage d'iodure contenu dans chacun de ces pics II_a , II_b , II_c . Pour cela, nous avons appliqué la technique de Fletcher (1), légèrement modifiée pour permettre l'évaluation en iode stable.

Dans cette technique, on utilise la réaction chimique entre chlorure d'argent et iodure avec formation d'iodure d'argent. En pratique, on confectionne une colonne de chlorure d'argent ; l'iodure déposé est fixé par adsorption chimique, alors que les autres composés iodés passent librement.

Technique :

On prépare un précipité de chlorure d'argent à partir d'une solution de nitrate d'argent 4 M et d'une solution saturée de chlorure de sodium en milieu nitrique (50 ml de solution de nitrate d'argent auxquels on ajoute 1 ml d'acide nitrique concentré, puis 50 ml de solution de chlorure de sodium).

On lave le précipité par décantation avec de l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres. Avec ce précipité

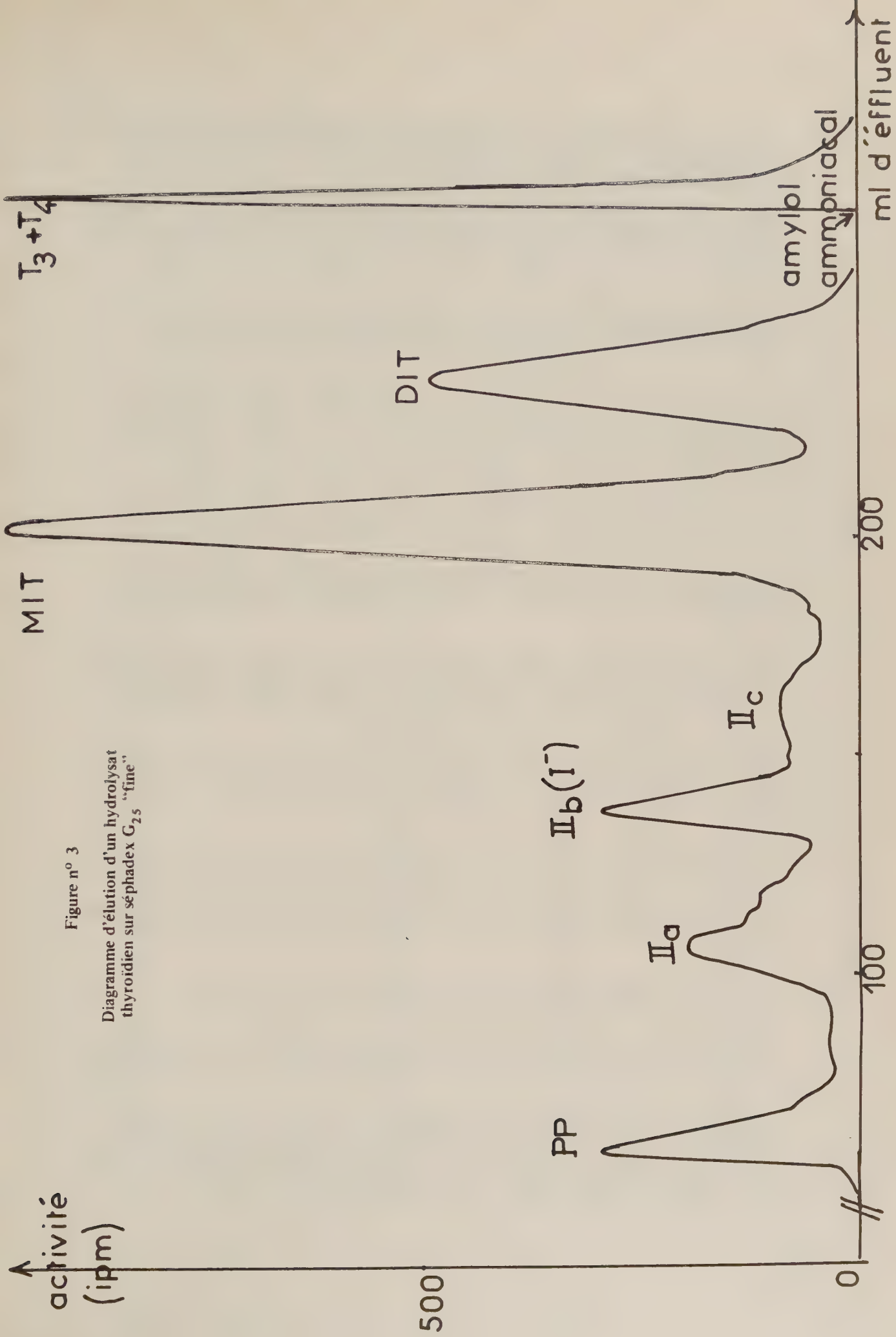


Figure n° 3

Diagramme d'élution d'un hydrolysate
thyroïdien sur séphadex G₂₅ "fine"

lavé, on confectionne une colonne de 1,3 x 6 cm. On fait alors passer environ 30 à 50 ml de tampon tris-HCl 0,05 M, pH = 7,4. La colonne est alors prête à l'emploi.

Nous avons effectué d'abord des essais avec des solutions renfermant un mélange d'acides aminés iodés et d'iodure stables et radioactifs. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

<u>Tableau n° VI</u> : Pourcentage de récupération d'iodure, MIT, DIT, après passage sur colonne de chlorure d'argent.						
	:	Iodure	:	MIT	:	DIT
Iode 125	:	1,6	:	87,9	:	79,2
Iode 127	:	0	:	97,7	:	87,1

Nous avons alors appliqué la technique aux fractions II_a, II_b, II_c de l'hydrolysate et à la fraction iodure de l'extrait non hydrolysé.

Pour les fractions iodure de l'extrait brut et II_b de l'hydrolysate, le pourcentage fixé sur la colonne (correspondant à l'iodure) a toujours avoisiné les 100 % (moyenne de 92 % pour la fraction II_b).

Pour les fractions II_a et II_c, ces pourcentages sont plus faibles bien qu'encore importants, surtout pour la fraction II_c (moyenne 80 %, contre 45 % pour la fraction II_a).

Tous ces essais tendent à montrer que l'iodure se trouve en majeure partie dans la fraction II_b, fraction que nous appellerons dorénavant fraction iodure, mais qu'une proportion faible d'iodure non négligeable, se situe dans les fractions II_a et II_c. En outre, ces deux dernières fractions contiennent des composés iodés non identifiés.

5 - 3 Les pics d'iodotyrosines et les difficultés de séparation.

L'élution des iodotyrosines du séphadex G₂₅ se fait dans l'ordre de leur degré d'iodation, c'est à dire MIT puis DIT. La séparation de ces deux composés est, dans la majorité des cas, satisfaisante.

Cependant, pour certains hydrolysats, nous avons obtenu des pics mal séparés, entraînant des erreurs assez importantes dans l'évaluation de chacun de ces composés. Cette mauvaise séparation advenait sans raison apparente. Nous avons alors essayé le séphadex G₁₀, espérant obtenir une meilleure séparation.

Emploi d'une colonne de séphadex G₁₀

Effectivement ce gel nous a donné des séparations parfaites, les ordres d'élution de MIT et DIT étant inversés (figure n° 4), mais deux raisons majeures nous l'ont fait abandonner :

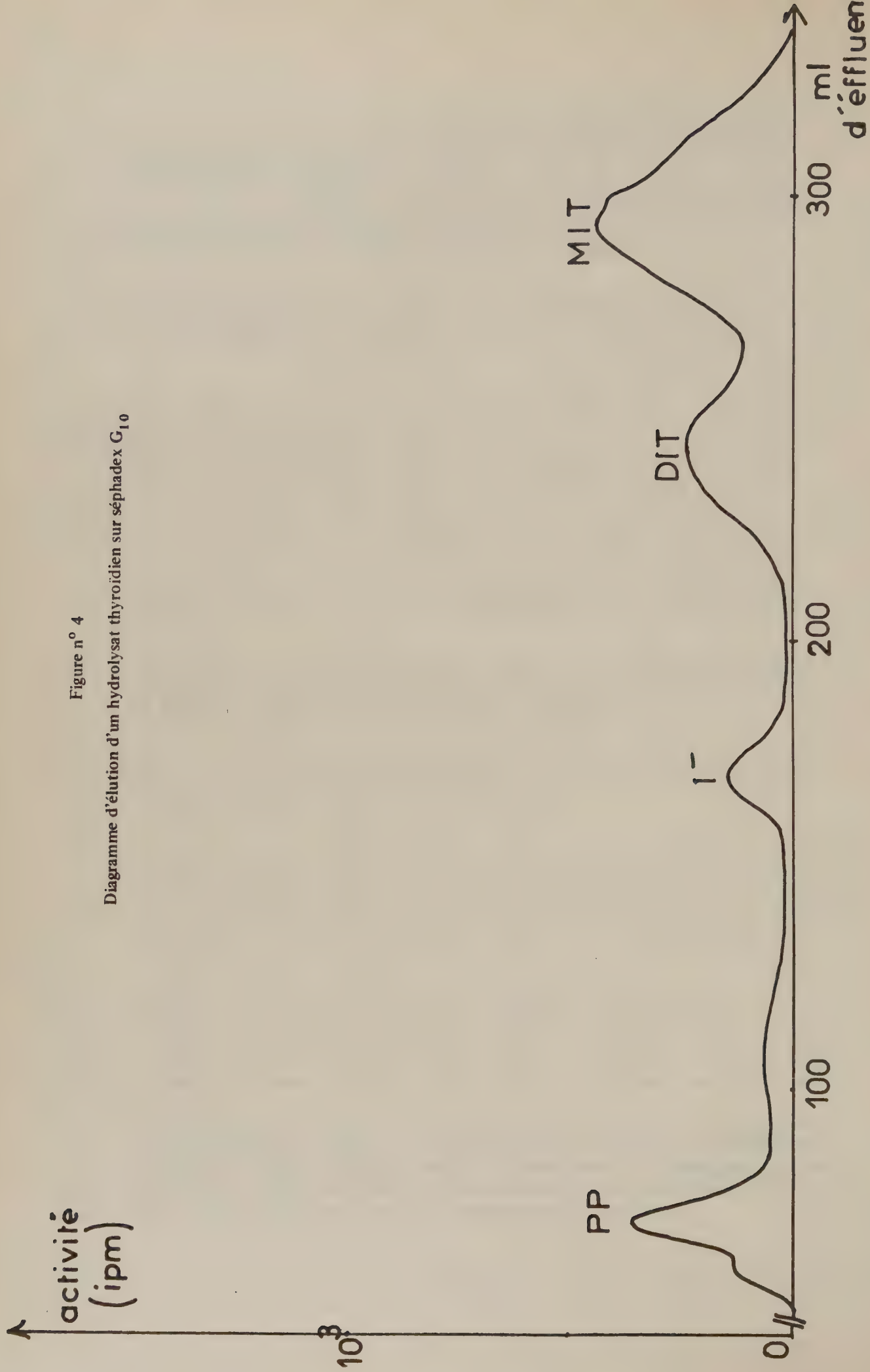
- . La première est un rendement plus faible en iodure, MIT et DIT qu'avec le séphadex G₂₅ (79 % pour iodure ; 80,6 % pour MIT ; 78,3% pour DIT).
- . Et surtout une adsorption plus forte des iodothyronines sur ce gel, qui rend très difficile leur élution de la colonne et aboutit à un rendement de 50 %.

Emploi d'un autre éluant

Devant cet écueil, nous avons gardé le séphadex G₂₅ comme support et nous avons, dans les cas où la séparation de MIT et DIT était insuffisante, remplacé le tampon tris-HCl 0,05 M pH 7,4, par l'éluant recommandé par Osborn (6) qui est un mélange pyridine-acide acétique-eau à pH 5,6. Nous avons préalablement effectué des dosages d'iode stable sur des solutions d'iodure et d'acides aminés iodés réalisés avec ce solvant, pour s'assurer de sa validité vis à vis du dosage. Les résultats figurent dans le tableau n° VII.

Ces résultats sont satisfaisants et comparables à ceux provenant du dosage dans le tampon tris-HCl.

(<u>Tableau n° VII</u> : Dosage de l'iode 127 de solutions d'iodure et)					
(d'acides aminés iodés à 10 µg/100 ml dans le)					
(solvant pyridine-acide acétique-eau.)					
(: Résultats en µg/100 ml)					
(:)					
(:)	9,1	:	9,8	:	9,8
(:)	9,4	:	9,6	:	9,8
(:)	9,6	:	9,4	:	9,8
(:)	9,6	:	9,6	:	10
(:)	9,6	:	9,6	:	10
(:)	9,6	:	9,4	:	9,9
(:)	9,6	:	9,5	:	9,9
(:)	9,9	:	9,4	:	9,9
(:)	9,6	:	9,4	:	9,8
(:)	9,6	:	9,4	:	9,9
(Moyenne :)	9,56	:	9,51	:	9,88
(% retrouvés :)	95,6	:	95,1	:	98,8



La figure 5 montre que l'élution se fait dans le même ordre qu'avec le tampon tris-HCl pH = 7,4, mais avec une séparation bien meilleure de MIT et DIT, due en particulier au pH plus acide de la solution éluante. Nous obtenons toujours les trois pics au niveau de l'iodure, et le décrochage de $T_3 - T_4$ par l'amyloï-ammoniacal est bon. L'emploi de ce tampon est donc très satisfaisant et est à conseiller. Cependant, tous nos essais et une partie de l'étude des hydrolysats ayant été déjà effectués avec le tampon tris avant la parution de l'article d'Osborn, nous avons continué avec ce tampon, réservant l'emploi de l'éluant d'Osborn aux hydrolysats pour lesquels la séparation des iodotyrosines s'évérait difficile.

De tous ces essais, nous pouvons conclure que, dans les conditions utilisées, la séparation sur séphadex G₂₅ "fine" des composés iodés est bonne, hormis bien entendu, celle des iodothyronines. Elle est très reproductible et présente l'énorme avantage de permettre la réalisation, dans de bonnes conditions et avec de bons résultats, du dosage chimique de l'iode stable de ces composés.

° °
°

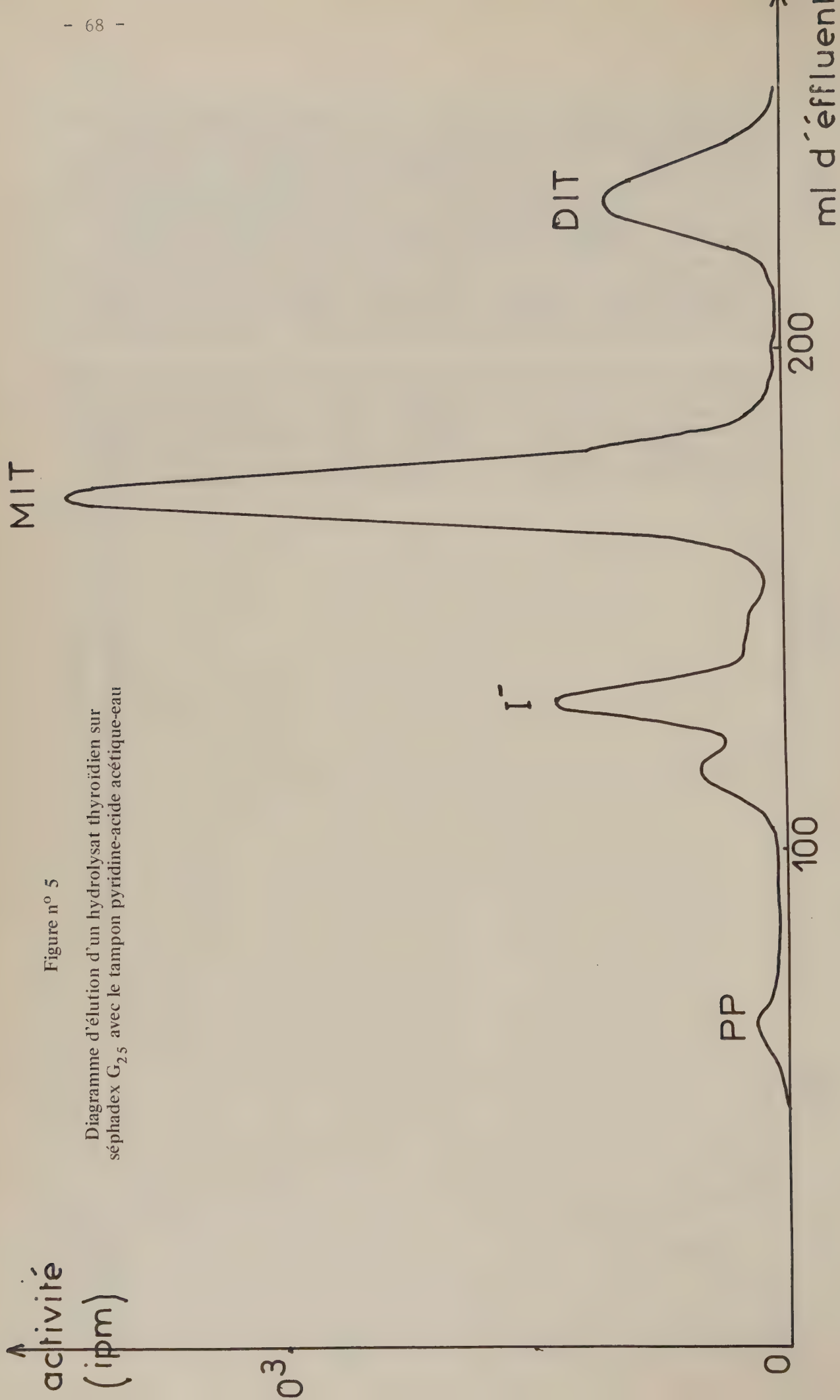


Figure n° 5

Diagramme d'élution d'un hydrolysât thyroïdien sur
séphadex G_{25} avec le tampon pyridine-acide acétique-eau

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - FLETCHER K.
The fractionation of urinary iodine-1. Method of analysis
Biochem. J. 1957, 67, 136-140.
- 2 - IMARISIO J.J., GRECO J.
Glass binding of labeled thyroxine and triiodothyronine
Biochim. Biophys. Acta. 1964, 82, 172-175.
- 3 - JONES J.E., SCHULTZ J.S.
Identification of thyroidal iodoamino acids by gel filtration and
automated ¹²⁷I determination.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 975-985.
- 4 - KENNEDY J.A., BESSES G.S.
Comparison of adsorption of iodine-131 thyroxine to glass and
plastic containers.
J. Nucl. Med. 1967, 8, 226-228.
- 5 - LISSITZKY S., BENEVENT M.T., ROQUES M.
Adsorption de la 3'5'131I-l-thyroxine sur le verre et désiodation.
Soc. Biol. MARSEILLE, Séance du 22 janvier 1960, 147-151.
- 6 - OSBORN R.H., SIMPSON T.H.
Gel filtration of iodoamino acids
J. Chromatogr. 1968, 34, 110-111.

° °
°

Chapitre III

ETUDE DES GLANDES THYROIDES NORMALES

Nous avons étudié 5 glandes ou fragments de glandes de sujets indemnes de toute affection thyroïdienne. Ces tissus ont été prélevés post mortem, 2 heures après la mort pour le 1er, moins d'une demi-heure après pour les autres.

Les tissus ont été immédiatement congelés à - 20° C., puis traités. Le traitement a été, en tous points, identique à celui des glandes pathologiques.

Ces glandes n'étant pas marquées in vivo, nous avons inclus dans l'extrait ou dans l'hydrolysate de l'extrait, avant la chromatographie, une petite quantité des différents corps radioactifs correspondant aux composés étudiés (iodure, MIT, DIT, T₄). L'activité spécifique de ces produits marqués était suffisamment élevée pour que la quantité d'iode stable introduite soit négligeable.

1. RESULTATS.

1 - 1 Concentration en iode 127 des tissus.

A la suite de l'extraction des tissus par le tampon tris-NaCl, nous avons effectué le dosage de l'iode 127 dans l'extrait, dans la solution de lavage et sur le culot de centrifugation, après avoir dissous celui-ci dans la soude M (cf. § 1 chap. 1).

Si "x" est la masse de tissu frais extrait en grammes,
"a" la masse d'iode 127 de l'extrait en microgrammes,
"b" la masse d'iode 127 de la solution de lavage en microgrammes,
"c" la masse d'iode 127 du culot de centrifugation en microgrammes,

la concentration en iode 127 des tissus, exprimée en µg/g de tissu frais est :

$$\frac{a + b + c}{x} .$$

Nous avons obtenu les résultats suivants :

<u>Tableau n° I</u> : Concentration en iode 127 des tissus thyroïdiens provenant de glandes normales.	
Glandes n°	Concentration en iode 127 (en µg/g de tissu frais).
1	235
2	494
3	1108
4	774
5	1176
Moyenne m	757,4
Ecart-type de la moyenne s _m	179,0

1 - 2 Pourcentage d'extraction de l'iode 127.

L'extraction a été réalisée conformément à ce qui est décrit § 1 chap. 1. En reprenant les données citées plus haut, le taux d'extraction nous est donné par la relation :

$$\frac{a + b}{a + b + c} \times 100$$

<u>Tableau n° II</u> : Taux d'extraction de l'iode 127 de thyroïdes normales.	
Glandes n°	Taux d'extraction (en %)
1	76,0
2	91,1
3	37,8
4	82,6
5	73,4
Moyenne	72,2
Ecart-type de la moyenne	9,12

Pour 4 glandes, le taux d'extraction est compris entre 73 et 91 %.

Pour la glande n° 3, ce pourcentage est faible et nous ne savons pas expliquer cette différence, l'extraction ayant été réalisée dans des conditions strictement identiques.

1 - 3 Distribution de l'iode stable dans les extraits.

Le passage des extraits totaux (additionnés des composés iodés radioactifs) sur le gel de séphadex G₂₅ "fine" (cf. § 3 - 1, chap. 1 et § 4 chap. 2) nous a permis de séparer plusieurs fractions (fig. n° 1) :

- Le 1er pic élué, apparaissant pour un volume d'élution égal au volume d'exclusion de la colonne (50 ml environ), correspond aux protéines iodées. Il apparaît, sur notre diagramme d'élution, sous forme d'un petit pic correspondant à l'iodure radioactif ajouté qui s'est adsorbé sur les protéines.
- Le 2ème pic est le pic d'iodure, très net, apparaissant pour un volume d'élution d'environ 120 ml et s'étalant sur 35 à 40 ml d'éluat.
- Puis, viennent la monoiodotyrosine (volume d'élution de 165 à 220 ml) et la diiodotyrosine (de 220 à 270 ml environ).
- Enfin, après changement du solvant d'élution, apparaissent l'ensemble des hormones T₃ et T₄. Le pic est asymétrique car nous avons ici un décrochage brutal et rapide des hormones fixées sur le gel.

Les résultats obtenus à partir de ces extraits totaux figurent dans le tableau n° III.

Tableau n° III : Distribution (en %) de l'iode stable dans les extraits totaux de thyroïdes normales.							
Glandes n°	Protéines	Iodure	MIT	DIT	T ₃ + T ₄		
1	96,2	0,5	1,5	1,3	0,4		
2	98,3	0,3	0,5	0,6	0,3		
3	93,9	1,3	0,3	0,3	4,2		
4	97,9	0,6	0,2	0,2	1,1		
5	96,2	0,9	0,5	0,4	2,0		
Moyenne	96,5	0,7	1,2		1,6		
Ecart-ty-pe de la moyenne.	0,78	0,17	0,43		0,72		

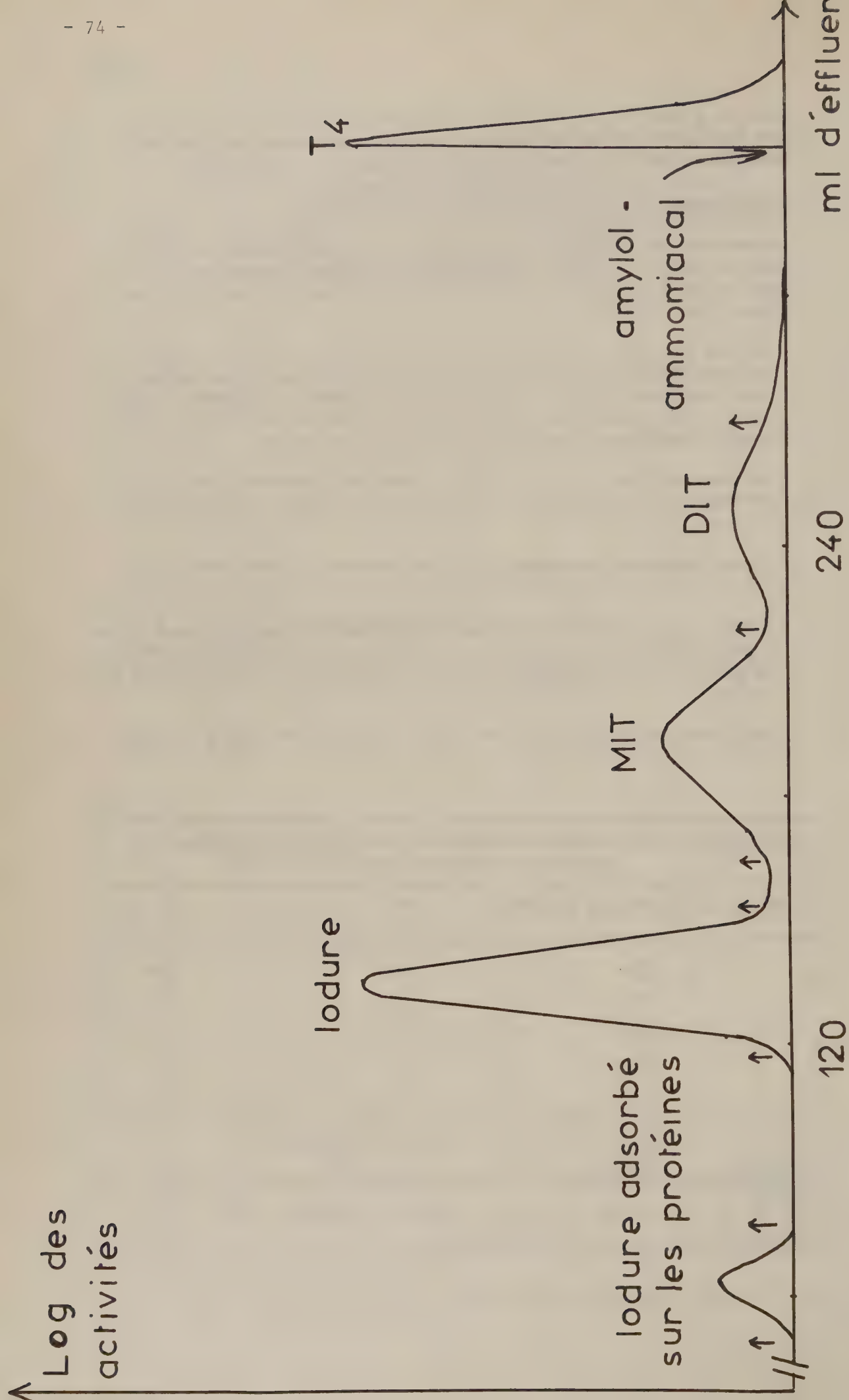


Figure n° 1 : Diagramme d'élution d'un extrait total de glande thyroïde normale, après addition de composés traceurs.

On constate qu'il existe une grande identité entre les taux de protéines des extraits, qui se situent tous très nettement au dessus de 90 %. "L'iode libre" se répartit à peu près de façon égale entre les différentes molécules avec, pour l'extrait n° 3, un taux d'hormones plus élevé. Il faut noter à ce sujet, que les quantités d'iode dosées dans chaque fraction, sont assez élevées pour être mesurées avec une précision suffisante et les résultats, exprimés en pourcentage, donnés avec une décimale significative.

Les taux d'iodure libre sont très faibles, et on peut, à partir de ces valeurs, calculer les masses d'iodure par gramme de tissu. Il suffit pour cela de multiplier les concentrations en iode 127 des tissus (tableau n° I) par les taux d'extraction de l'iode correspondant (tableau n° II) et par les pourcentages d'iodure libres trouvés dans l'extrait (tableau n° III). Les résultats de ces calculs figurent dans le tableau n° IV.

<i>Tableau n° IV : Masse d'iode minéral contenu par gramme de tissu frais.</i>		
Glandes n°	:	Masse d'iodure 127 (en µg/g de tissu)
1	:	0,9
2	:	1,4
3	:	5,5
4	:	3,8
5	:	7,8
Moyenne		3,94
Ecart-type de la moyenne		1,28

1 - 4 Distribution de l'iode stable dans les hydrolysats des extraits.

Nous obtenons, après passage sur colonne de gel de séphadex G25 "fine", le même diagramme d'élution que pour l'extrait total mais avec une différence : le 1er pic radioactif, correspondant à l'adsorption de l'iodure sur les protéines, n'apparaît pas. Nous avons cependant dosé l'iode dans un volume d'éluat égal à celui obtenu pour les protéines iodées de l'extrait total, cet iode correspondant aux polypeptides iodés non hydrolysés.

Lors de la séparation des hydrolysats d'adénomes toxiques et des tissus périnodulaires, nous avons constamment observé, de part et d'autre du pic d'iodure, deux pics iodés que nous avons baptisés II_a et II_c (cf. § 5 - 2 chap. 2) et dont nous n'avons pu déterminer le contenu. Devant cette constance et devant la grande reproductibilité des séparations sur séphadex, il nous a semblé utile de doser l'iode stable dans les fractions d'éluat situées en deçà

(de 100 à 120 ml d'éluat) et au delà (de 150 à 165 ml) du pic d'iodure pour ces hydrolysats de glandes normales, et de garder l'appellation II_a et II_c pour ces fractions.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° V.

Tableau n° V : Distribution (en %) de l'iode stable dans les hydrolysats d'extraits de glandes thyroïdes normales.										
Glandes n°	Polypeptides	II _a	Iodure	II _c	MIT	DIT	T ₃ +T ₄	MIT	DIT	
1	3,2	2,5	3,9	1,3	36,1	22,3	30,7	1,62	0,38	
2	4,2	1,4	6,0	2,2	23,9	31,5	30,9	0,76	0,57	
3	7,2	1,9	6,7	2,3	24,5	18,8	38,6	1,30	0,43	
4	5,5	1,8	6,9	3,7	30,0	22,0	30,0	1,36	0,42	
5	4,3	3,5	9,4	2,8	24,9	29,3	25,7	0,85	0,54	
Moyenne	4,8	2,2	6,6	2,5	27,9	24,8	31,2	1,12	0,47	
s _m	0,68	0,36	0,88	0,39	2,33	2,40	2,08	0,16	0,04	

Ces résultats nous montrent une bonne homogénéité entre les différents hydrolysats. Les taux d'iodure sont plus élevés que dans les extraits totaux, cette élévation provenant sans doute de la désalogénation provoquée lors de l'hydrolyse.

2. DISCUSSION.

Avant de discuter les résultats obtenus, il faut signaler la difficulté que nous avons eue à obtenir des tissus thyroïdiens normaux. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes limités à 5 glandes, ce nombre nous paraissant suffisant dans un 1er temps pour comparer les résultats avec ceux de l'adénome toxique.

La congélation immédiate des glandes a rendu difficile l'étude histologique. Seuls 2 examens sont interprétables (glandes n° 4 et 5) ; ils montrent une glande au repos avec des vésicules de taille moyenne, rappelant l'adénome colloïde.

Comme nous l'avons déjà souligné après chaque tableau, il existe une bonne cohérence entre nos résultats, avec cependant une exception pour la glande n° 3, dont le taux d'extraction est faible et le taux d'hormones libres plus élevé.

Les concentrations en iode stable présentent une amplitude assez importante (de 235 à 1176 µg/g). Les résultats trouvés dans la littérature montrent toutefois que nos résultats sont du même ordre de grandeur. Ermans (3), sur 2 sujets enthyroïdiens, opérés pour des

épithéliomas du pharynx ou de la langue, a trouvé une concentration moyenne de 620 $\mu\text{g/g}$ de tissu frais (amplitude : 360 à 990 $\mu\text{g/g}$), le dosage étant effectué par la méthode de radioactivation. Cet auteur avait trouvé auparavant (2) sur 6 glandes normales une moyenne de 520 $\mu\text{g/g}$. Bornet, dans sa thèse (1) donne, pour 2 glandes normales des quantités d'iode 127 de 584 et 419 $\mu\text{g/g}$, ces résultats étant obtenus par voie chimique. Wahner et coll. (7) citent une concentration moyenne de 701 $\mu\text{g/g}$ avec un écart-type de 190 $\mu\text{g/g}$, résultats obtenus à partir de 21 autopsies de sujets euthyroïdiens, alors qu'Etling et coll. (4) donne la valeur moyenne de 452 $\mu\text{g/g}$ pour 5 témoins.

Quant à la répartition des acides aminés et de l'iodure dans les hydrolysats d'extraits, plusieurs points sont à préciser :

- D'une façon générale, les taux d'iodure que nous avons obtenus sont faibles comparés à ceux de la littérature. Ceci peut provenir de notre technique d'hydrolyse, bien que celles employées par les autres auteurs (3, 5) soient très voisines. Par contre, si l'on ajoute à l'iodure, l'iode correspondant aux fractions II_a et II_c , nos pourcentages obtenus sont très proches de ceux des autres auteurs.

Les essais préalables que nous avons effectués sur colonne de séphadex (§ 2 - 1 et 2 - 2 chap. 2) n'ont pas mis en évidence de désiodation importante des produits iodés chromatographiés, et ceci peut expliquer nos résultats ; Jones et Schultz (5) étudiant la même technique de séparation sur des hydrolysats de tissus thyroïdiens humains, normaux et pathologiques, trouvent des taux très voisins des nôtres.

- Les taux d'hormones stables sont plus élevés que ceux de la littérature : pratiquement tous nos résultats (excepté la glande n° 4) se situent au dessus de 30 %. Ermans et coll. (3) ont trouvé un taux moyen de 12 % par chromatographie sur Dowex 50 x 4 et 23,8 % par chromatographie sur papier à partir de 2 glandes normales, et un taux moyen de 10,7 % à partir de 6 glandes (2). Jones et Schultz (5) étudiant des tissus sains adjacents à un goître colloïde et à un carcinome obtiennent des résultats de 1,6 et 6,8 %.

Cette différence peut en partie s'expliquer par le fait que nos hydrolysats ont été placés sur la colonne après agitation, sans centrifugation. En effet les travaux de Rosenberg et Laroche (6) ont montré que cette centrifugation préalable, utilisée par les auteurs précités (sauf par Ermans utilisant la chromatographie sur papier) provoque une adsorption des hormones sur les particules présentes dans l'hydrolysat et diminue, pour cette raison, les taux d'hormones trouvés. Il faut noter que le taux de 23,8 % trouvé par Ermans par chromatographie sur papier est assez voisin de nos résultats.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BORNET H.
Etude des extraits salins de glandes thyroïdes bovines et humaines par filtration sur gel.
Thèse de doctorat d'Etat en Pharmacie Lyon 1969.
- 2 - ERMANS A.M., DECOSTRE P., KINTHAERT J., COLLARD J.
Kinetics of the synthesis of thyroid hormones in normal man and in simple goiter.
Current topics in thyroid research. Proceedings of the 5th international thyroid conference 1965, Acad. Press. New-York, 832-837.
- 3 - ERMANS A.M., KINTHAERT J., DELCROIX C., COLLARD J.
Metabolism of intrathyroidal iodine in normal men.
J. Clin. Endocr. 1968, 28, 169-180.
- 4 - ETLING N., MARTIN A., VALLEE G., LACHIVER F.
Iodation de protéines de la thyroïde humaine (normale et pathologique).
Acta Endocrin. 1968, 59, 545-554.
- 5 - JONES J.E., SCHULTZ J.S.
Identification of thyroidal iodoamino acids by gel filtration and automated ¹²⁷I determination.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 975-985.
- 6 - ROSENBERG L.L., LAROCHE G.
Determination of iodoamino acid composition of rat thyroidal iodoprotein : some sources of serious error.
Endocrinology 1964, 75, 776-786.
- 7 - WAHNER H.W., GARTAN E., CORREA P.
Studies of iodine metabolism in endemic nodular goiter.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 279-286.

Chapitre IV

ETUDE DES ADENOMES TOXIQUES

Notre étude a porté sur 16 cas d'adénomes toxiques présentant pour la plupart des images cartographiques typiques (fixation de l'iode radio-actif strictement limitée au nodule tumoral) et des signes cliniques et biologiques de toxicité.

Le diagnostic d'adénome toxique a été confirmé par l'anatomopathologie de la pièce opératoire et par la guérison post opératoire des signes cliniques et biologiques avec, un retour de l'image scintigraphique à la normale. Les différentes données sont réunies dans le tableau n° I.

Tableau n° I : Principaux signes cliniques et biologiques confirmant le diagnostic d'adénome toxique chez les sujets étudiés.

Cas n°	Sexe	Age	Tachycardie	Amaigrissement	Cartographie	PBI (µg/100 ml de sérum)
1 MOREL.	F	41	+	+	T	6,4
2 FRADI.	F	73	+	+	T	11,1
3 FRAIS.	F	68	+	+	T + CL	14
4 GUERP.	H	27	0	+	Atypique	8,4
5 JARRI.	F	20	+	+	T	5,8
6 ENGEL.	H	60	+	+	T	
7 GERBE.	F	71	0	0	T	3,8
8 GUERI.	F	59	+	+	T	15
9 POUDE.	F	25	+	+	T + CL	7,2
10 CLAUZ.	F	14	0	+	T + CL	6,6
11 LAPRU	F	49	+	+	T	12,2
12 DUROC.	F	32	0	0	T	
13 DONAD.	F	46	+	+	T	10,8
14 FUSIL.	H	27	0	0	T + CL	6,4
15 FOURN.	F	45	0	0	T	9,9

F = femme ; H = homme ; T = image d'adénome toxique ; CL = image contro-latérale.

Aucun de ces malades n'a été préalablement traité par l'iode ou par des antithyroïdiens.

Marquage in vivo par l'iode radioactif.

La plupart des patients ont reçu 2 doses traceuses d'iode radioactif, l'une quelques jours avant l'intervention (de 3 à 40 jours), l'autre la veille.

De plus 3 patients (cas n° 4, 8, 11) ont reçu 100 unités de TSH pendant 3 jours, à un moment situé entre les 2 doses traceuses d'iode radioactif : 6, 7, 8 jours avant pour le n° 4,

8, 9, 10 jours avant l'intervention pour le patient n° 8,

3, 4, 5 jours avant pour le patient n° 11.

Enfin, l'un des malades (Cas n° 9) a eu ses 2 doses d'iode radioactif sous L-T3. (4 comprimés par jour depuis le 42ème jour avant l'intervention).

Tout ceci est résumé dans le tableau n° II.

<u>Tableau n° II</u> : Doses traceuses d'iode radioactif : jours séparant l'ingestion de l'intervention.				
Cas n°	Iode 125 (jours)	Iode 131 (jours)	Thérapeutique	
2	8	1	TSH	
3	16	1		
4	14	5		
5	13	1		
6	8	1		
7		1		
9	40		T 3	
10	40	1		
11	3	9	TSH	
12	1			
13		11		
14	4			
15	9	1		

Prélèvement des tissus.

Le prélèvement est effectué par intervention chirurgicale. L'adénome est enlevé avec, dans la plupart des cas, un fragment de tissu sain périnodulaire servant de témoin pour l'analyse physico-chimique.

Les tissus prélevés sont immédiatement placés dans un récipient, main-

tenu dans la glace ou la neige carbonique et apporté au laboratoire.

Ces tissus sont pesés et traités de suite ou, pour certains, placés dans un congélateur à -20° C en attendant l'extraction des composés solubles. Celle-ci est effectuée selon la technique décrite au paragraphe : "préparation de l'extrait glandulaire" du chapitre : "description des techniques utilisées".

1. RESULTATS.

1 - 1 Concentration en iode 127 des tissus.

Pour les premières glandes étudiées (glandes 1 à 7 comprise), nous avons dosé l'iode stable uniquement dans l'extrait, ce qui correspond à l'iode extractible. Nous avons ramené cette masse d'iode 127 à la masse de tissu frais, sachant que 3 ml d'extrait correspondent à 1 gramme de tissu frais (cf. § 1 chap. 1).

Pour les autres glandes, le dosage a été fait dans l'extrait et dans le culot de centrifugation dissous dans la soude M, ce qui nous permet de connaître la masse totale d'iode stable de ces tissus.

Les résultats figurent dans les tableaux n° III et IV.

<u>Tableau n° III</u> : Masses d'iode 127 extractible par gramme de tissu adénomateux	
cas n°	: Microgrammes d'iode par gramme de tissu frais.
1	: 104
2	: 234
3	: 255
4	: 61
5	: 73
6	: 160
7	: 47
8	: 266
9	: 134
10	: 198
11	: 174
12	: 201
13	: 216
14	: 44
15	: 131
Moyenne	: 153,2
Ecart-type de la moyenne	: 19,5

Les résultats de l'iode extractible sont assez dispersés, allant de 44 μg à 266 μg avec une moyenne de 153,2 μg .

Les différences observées entre les masses d'iode extractible et d'iode total pour les tissus 8 à 15 sont en général assez faibles, à l'exception, peut-être, des numéros 12 et 15 pour lesquels les taux d'iode extractible représentent respectivement 71 % et 63 % de l'iode total.

Tableau n° IV : Masses d'iode 127 total par gramme de tissu adénomateux.		
Cas n°	:	Microgrammes d'io- de par gramme de tissu frais.
8	:	317
9	:	144
10	:	262
11	:	193
12	:	284
13	:	264
14	:	50
15	:	208
Moyenne	:	215,2
Ecart-type de la moyenne.	:	30,6

1 - 2 Pourcentage d'extraction de l'iode.

Les taux d'extraction ont été déterminés comme il est décrit dans le paragraphe 1 du chapitre 1. Tous les chiffres qui figurent dans le tableau n° V résultent d'une extraction de 24 heures, suivie d'un lavage.

Les chiffres obtenus sont très voisins pour les deux isotopes radioactifs de l'iode, ingérés entre 1 et 40 jours avant l'intervention, la différence entre les moyennes n'étant pas significative au seuil de 5 % (test de Cochran). La moyenne des pourcentages d'extraction de l'iode stable est plus basse, significativement différente de celle de l'iode ingéré 1 jour avant l'intervention (test de Cochran), mais non différente au seuil de 5 % de celle de l'iode ingéré de 3 à 40 jours avant l'intervention (test de Student).

Tableau n° V : Pourcentage d'extraction de l'iode dans l'adénome

Cas n°	Iode radioactif ingéré 1 j avant	Iode radioactif ingéré 3 à 40 j. avant	Iode 127
1	92,1		
2	93,1	89,3	
3	99,0	100,0	
4	86,5	85,9	
5	93,4	76,2	
6	91	80,6	
7	90,7	92,3	
8	87,8		84,0
9	92,5	90,4	93,0
10	90,3	75,4	85,3
11	93,7	92,6	89,9
12		90,8	70,8
13	95,0		81,7
14		92,9	87,2
15	93,2	90,0	63
Moyenne	92,2	88,0	81,9
Ecart-type de la moyenne	0,9	2,1	3,6

1 - 3 Quantité d'iode radioactif fixé par gramme de tissu thyroïdien frais exprimée en pourcentage de la dose ingérée.

Les chiffres obtenus sont le résultat du calcul suivant, effectué pour chaque extrait et pour chaque isotope radioactif :

$$\frac{\text{Activité de l'extrait en } \mu\text{Ci, correspondant à 1 gramme de tissu thyroïdien frais}}{\% \text{ d'extraction} \times \text{nombre de microcuries ingérés.}} \times 100$$

Ces pourcentages diminuent au cours du temps, ce qui correspond à la sortie de l'iode de la glande ; le coefficient de corrélation linéaire n'est pas significatif ($r = 0,35$, $p > 0,1$). Nous avons procédé à l'ajustement de la fonction $\frac{1}{a + bx}$, fonction pour laquelle le coefficient de corrélation linéaire entre $\frac{1}{y}$ et x est de 0,67 ($p < 0,001$) ce qui nous permet de considérer cette régression non linéaire de y en x comme valable (il n'est pas pos-

sible d'effectuer le calcul du rapport de corrélation qui nous permettrait de tester la signification d'une corrélation non linéaire, le nombre de points n'étant pas suffisant) (figure n° 1, tableau VI).

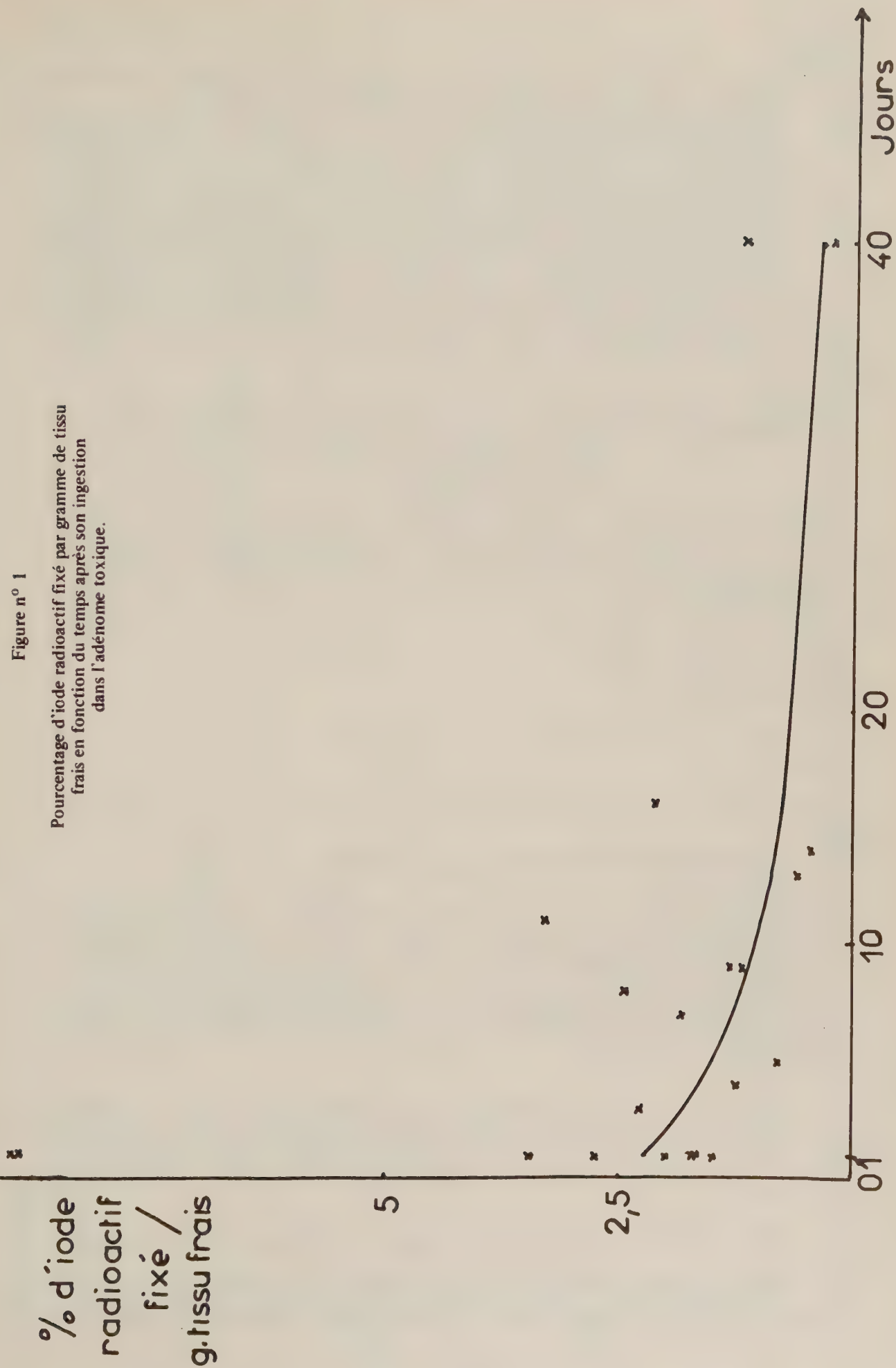
Tableau n° VI : Iode radioactif fixé par le tissu adénomateux (exprimé en pourcentage de la dose ingérée par gramme de tissu frais).		
Cas n°	Temps (en jours) séparant l'ingestion de l'intervention	Pourcentage d'iode radioactif fixé par gramme de tissu frais).
2	1	1,72
3	1	1,99
5	1	2,73
6	1	3,45
7	1	1,69
10	1	8,89
12	1	8,95
15	1	1,48
11	3	2,27
14	4	1,24
4	5	0,80
2	8	1,84
6	8	2,44
11	9	1,31
15	9	1,19
13	11	3,28
5	13	0,70
4	14	0,43
3	16	2,13
9	40	0,24
10	40	1,20

Les pourcentages de l'iode fixé 1 jour après l'ingestion sont compris entre 1,50 et 3,50 % sauf pour les cas n° 10 et 12, pour lesquels la fixation est beaucoup plus importante et située aux alentours de 9 % (tableau n° VI). A priori, aucun élément susceptible d'expliquer cette différence n'est apporté par la clinique, ni par les autres résultats obtenus dans l'analyse du tissu.

Si l'iode radioactif fixé diminue au cours du temps (figure n° 1), on peut cependant constater que pour les six tissus pour lesquels

Figure n° 1

Pourcentage d'iode radioactif fixé par gramme de tissu
frais en fonction du temps après son ingestion
dans l'adénome toxique.



nous connaissons les quantités d'iode radioactif fixées au premier jour et à une date ultérieure, trois ont un rapport $\frac{\text{activité fixée à "x" jours}}{\text{activité fixée au 1er jour}}$ légèrement supérieur à 1 (tableau n° VII). Ces chiffres se retrouvent pour deux d'entre eux (cas n° 2 et 6) dans le tissu périnodulaire. Etant donné l'intervalle de temps assez long séparant l'ingestion des deux isotopes (7 et 15 jours), ces résultats montrent, pour ces tissus, une vitesse de renouvellement de l'iode très lente. Par contre pour les cas n° 5 et 10, pour lesquels ce rapport est faible, la vitesse de renouvellement de l'iode doit être rapide, ce qui est vérifié par les taux d'hormones de ces tissus qui sont déjà, au premier jour, respectivement de 19,5 % et 17,4 % (tableau n° XI).

<i>Tableau n° VII</i> : Rapport des activités fixées (exprimées en % de la dose ingérée et par gramme de tissu frais) de l'iode radioactif ingéré 1 jour et "x" jours avant l'intervention.		
Cas n°	Intervalle de temps séparant l'ingestion des 2 isotopes.	$\frac{\text{Activité fixée à "x" jours}}{\text{Activité fixée à 1 jour.}}$
2	7	1,07
3	15	1,07
5	12	0,26
6	7	1,44
10	39	0,13
15	8	0,80
:	:	:

1 - 4 Distribution de l'iode dans les extraits.

La séparation des extraits sur gel de séphadex G₂₅ nous a permis d'obtenir deux pics : un pic d'iode radioactif très important apparaissant pour le volume d'exclusion de la colonne et correspondant aux protéines iodées, et un pic beaucoup moins important d'iodure radioactif (figures n° 2 et 3). Dans certains extraits, on constate l'apparition de pics très faibles de MIT et DIT radioactives, et d'un pic d'hormones marquées, après changement du solvant d'élution.

Dans tous les cas, étant donné la reproductibilité de la méthode, nous avons dosé l'iode stable dans les fractions d'éluat correspondant aux fractions MIT, DIT et hormones, même lorsque celles-ci n'apparaissent pas sur le diagramme d'élution de l'iode radioactif.

Les résultats obtenus figurent dans les tableaux n° VIII, IX, X.

Les résultats montrent que l'iode radioactif, quelquesoit la date à laquelle il ait été donné avant l'intervention, se répartit

↑ Activité ^{131}I
en ipm/2ml

Cas n° 4

Figure n° 2

Diagramme d'éluion d'un extrait
thyroïdien d'adénome toxique
sur séphadex G_{25} "fine"

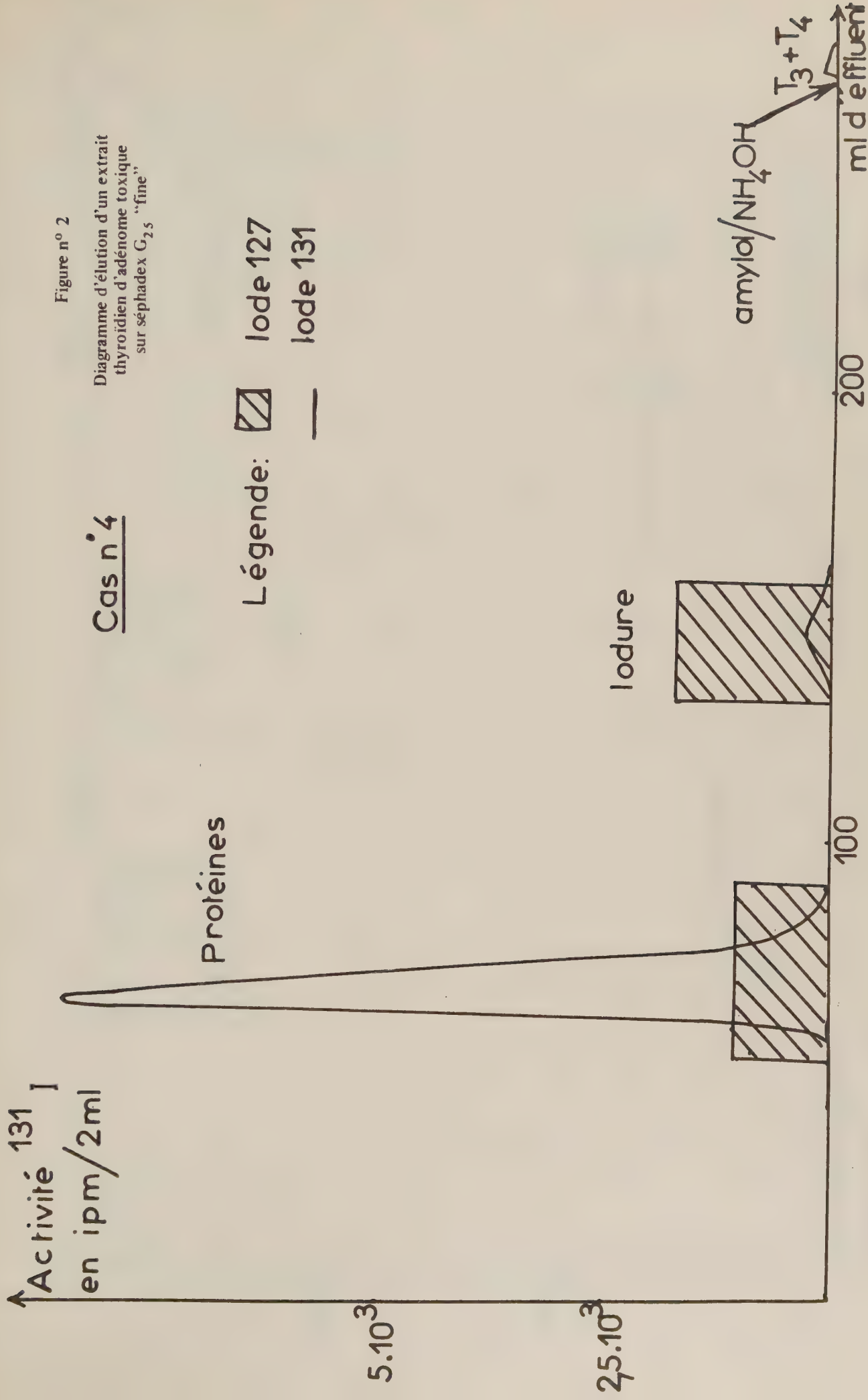
Protéines

Légende:  lode 127
 lode 131

Iodure

amylol/ NH_4OH

$\text{T}_3 + \text{T}_4$
ml d'effluent



Activité ^{131}I
en ipm/2ml

Cas n° 11

Figure n° 3

Diagramme d'élution d'un extrait
thyroïdien d'adénome toxique
sur séphadex G_{25} "fine"

Protéines

Iodure

amylol/ NH_4OH

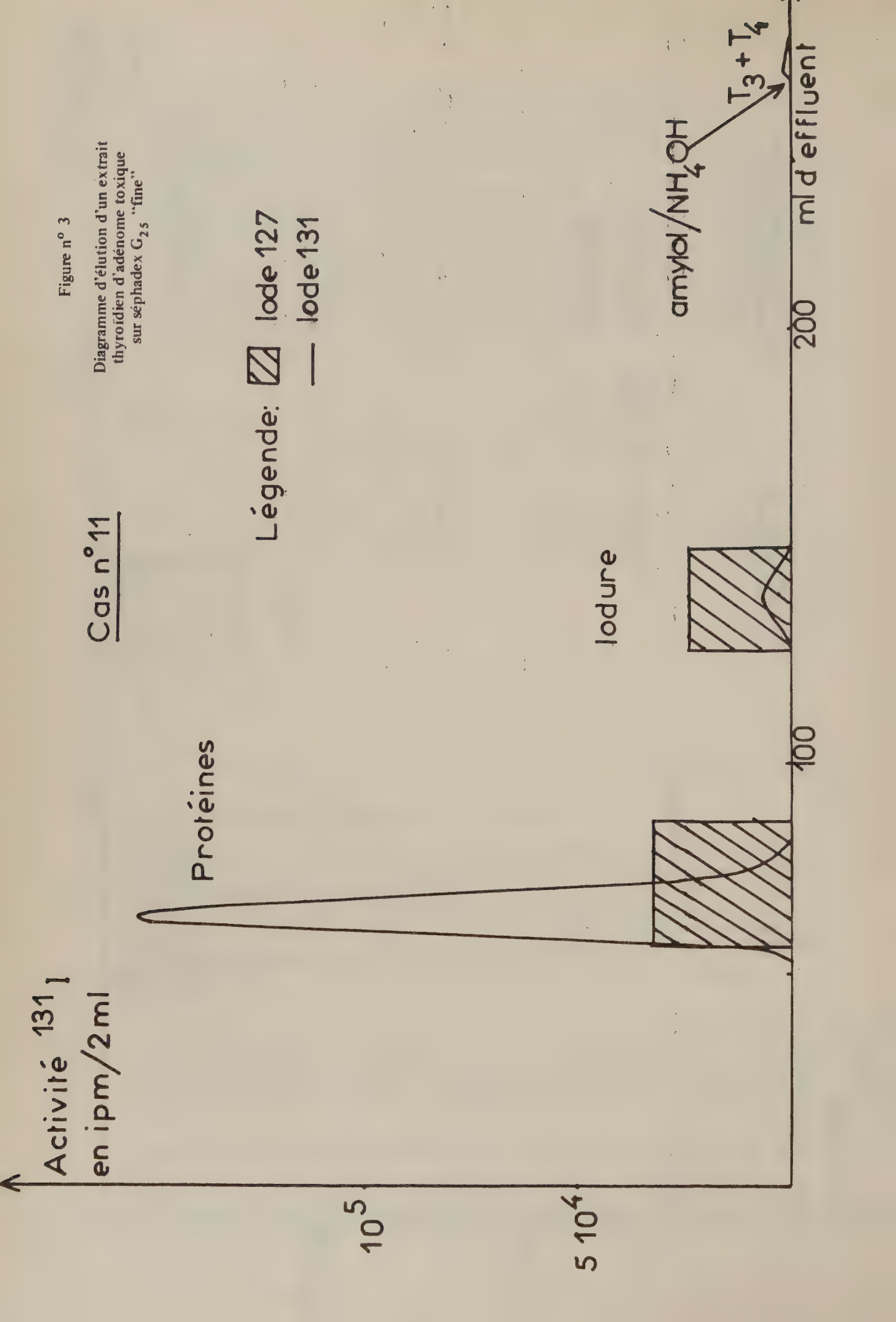
$\text{T}_3 + \text{T}_4$

200

100

ml d'effluent

Légende:  Iode 127
— Iode 131



pratiquement en 2 seuls pics :

- Le pic de protéines iodées, qui représente de 95 à 100 % de l'iode radioactif total.
- Le pic d'iodure, beaucoup plus faible puisque variant de 0 à 5 %.

Les autres pics éventuels ne correspondent qu'à une fraction minime de l'iode radioactif total.

Par contre, les chiffres d'iode stable sont très différents :

- Le pic de protéines est nettement diminué dans la majorité des cas, cette diminution étant compensée par une augmentation importante de l'iode minéral pouvant atteindre dans certains cas près de 75 % de l'iode stable total. Nous avons exprimé dans le tableau n° XI cet iode minéral en $\mu\text{g/g}$ de tissu frais. Ces chiffres sont obtenus en multipliant les masses d'iode-127 extractible par gramme de tissu frais (tableau n° III) par le pourcentage d'iodure obtenu après séparation de l'extrait sur séphadex. Ces valeurs sont extrêmement élevées si on les compare à celles des tissus normaux qui sont respectivement de 0,9 ; 1,4 ; 5,4 ; 3,8 ; 7,8 $\mu\text{g/g}$ de tissu.

Les proportions d'acides aminés libres sont très faibles, quelque soit l'isotope, n'atteignant pas 1 % (sauf pour le cas n° 13 où le taux de T_4 est de 1,2 %).

Tableau n° VIII : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les extraits d'adénomes toxiques 1 jour après son ingestion.

Cas n°	Protéines iodées	Iodure	MIT	DIT	T_3+T_4
2	98,6	1,4			
3	95,2	4,5	< 0,1	< 0,1	0,1
5	95,7	4,1			0,2
6	98,8	1,1			0,1
7	98,1	1,6	0,1	0,1	0,1
10	95,6	4,3			0,1
12	97,1	1,5	0,9	0,3	0,2
15	98,5	1,4			0,1
Moyenne	97,2	2,5	0,3		
Ecart-type de la moyenne	0,5	0,5			

Tableau n° IX : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les extraits d'adénomes toxiques 3 à 40 jours après son ingestion.

Cas n°	Temps entre ingestion-intervention	proté- ines	Iodure	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
11	3	98,2	1,1	0,2	0,3	0,2
14	4	94,7	5,1			0,2
4	5	97,4	2,6			< 0,1
2	8	99,5	0,5			
6	8	99,1	0,8			0,1
11	9	98,1	1,1	0,3	0,4	0,2
15	9	99,0	0,7	< 0,1	< 0,1	0,15
13	11	98,3	1,2	0,2	0,1	0,2
5	13	95,4	4,3			0,3
4	14	97,2	2,7			0,1
3	16	98,0	1,8	< 0,1	< 0,1	0,1
9	40	96,3	3,3			0,4
10	40	97,4	2,4			0,2
Moyenne		97,6	2,1		0,3	
Écart-ty: pe de la: moyenne		0,4	0,4			

Tableau n° X : Distribution (en %) de l'iode stable dans les extraits d'adénomes toxiques.

Cas n°	Protéines	Iodure	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
1	31,0	68,6		0,1	0,3
2	92,7	7,1			0,2
3	77,8	21,7	0,2	0,1	0,2
4	48,7	50,1	0,3	0,4	0,5
5	24,9	74,6	0,2	0,15	0,15
6	71,8	27,2	0,4	0,4	0,2
7	23,3	74,9	0,6	0,7	0,5
8	97,1	2,4	0,15	0,2	0,15
9	31,9	67,4	0,2	0,3	0,2
10	49,8	49,3	< 0,1	< 0,1	0,8
11	61,9	37,1	0,3	0,4	0,2
12	36,0	63,4	0,3	0,2	0,1
13	68,1	29,2	0,7	0,8	1,2
14	61,3	36,7	0,6	0,5	0,9
15	98,7	0,7	0,2	0,1	0,2
Moyenne	58,3	40,7	0,3	0,3	0,4
Ecart-type					
(pe de la	6,7	6,7	0,05	0,06	0,08
moyenne					

Tableau n° XI : Masse d'iode minéral contenu par
gramme de tissu frais dans 15 adé-
nômes toxiques.

Glandes n°	:	Masse d'iodure 127 (en µg/g de tissu)
1	:	71,3
2	:	16,6
3	:	55,3
4	:	30,6
5	:	54,5
6	:	43,5
7	:	35,2
8	:	6,4
9	:	90,3
10	:	97,6
11	:	64,6
12	:	127,4
13	:	63,1
14	:	16,1
15	:	0,9
Moyenne	:	51,6
Ecart-type de la moyenne	:	9,2

1 - 5 Distribution de l'iode dans les hydrolysats.

Les figures n° 4 et 5 montrent des diagrammes typiques d'élution, obtenus après passage des hydrolysats sur séphadex G₂₅.

Les pourcentages de l'iode contenu dans chacun des composés iodés séparés par chromatographie sur colonne de séphadex figurent dans les tableaux n° XII, XIII, XIV.

Le premier (tableau n° XII) correspond à une étape de 1 jour dans l'hormonosynthèse.

Le deuxième (tableau n° XIII) correspond à une étape située entre 3 et 40 jours.

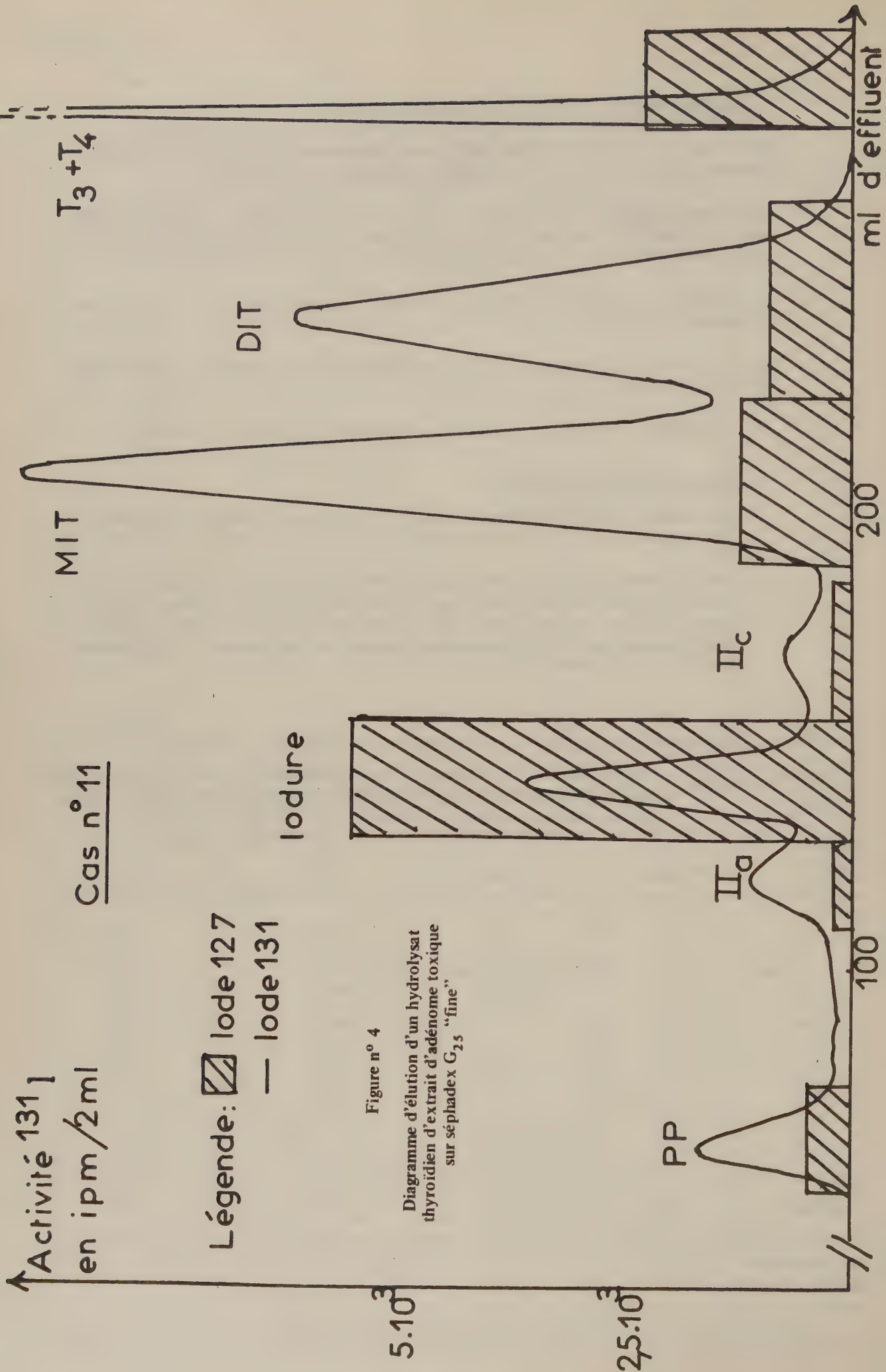
Le troisième (tableau n° XIV) correspond à l'état d'équilibre.

1 - 5 - 1 Fraction non hydrolysée

La fraction non hydrolysée est relativement faible (toujours inférieure à 10 %), et cela quel que soit le temps de biosynthèse.

Des chromatographies sur papier, réalisées sur les extraits butanoliques de cette fraction (l'extraction a été respectivement de 81,6 % et 86,5 % pour les 2 essais effectués chez 2 sujets différents) suivies d'autoradiographies ont montré la présence dans cette fraction de thyroxine.

(<u>Tableau n° XII</u> : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les composés (iodés d'hydrolysats d'extraits d'adénome toxiques 1 jour (après son ingestion.) ()								
Cas n°	Polypep	IIa	Iodure	IIc	MIT	DIT	T ₃ + T ₄	
2	2,7	2,2	7,4	3,7	34,2	38,6	11,1	
3	3,7	5,1	10,1	5,8	38,2	28,5	8,6	
5	1,1		12,7		48,2	18,5	19,5	
6	3,1	9,9	5,5	5,9	45,1	22,9	7,7	
7	1,5	7,6	6,9		46,8	29,9	7,3	
10	4,0	3,2	8,3	3,2	36,0	27,9	17,4	
12	1,9	0,9	6,7		30,5	17,2	42,8	
15	4,7	4,3	6,4	3,3	41,8	25,4	14,1	
Moyenne	2,8	4,7	7,3	3,1	40,1	26,1	16,0	
Ecart-type (de la moyen (ne	0,5	1,2	0,6	0,9	2,3	2,4	4,1	



Activité ^{131}I
en ipm/2 ml

Cas n° 3

Légende:  lode 127
— lode 131

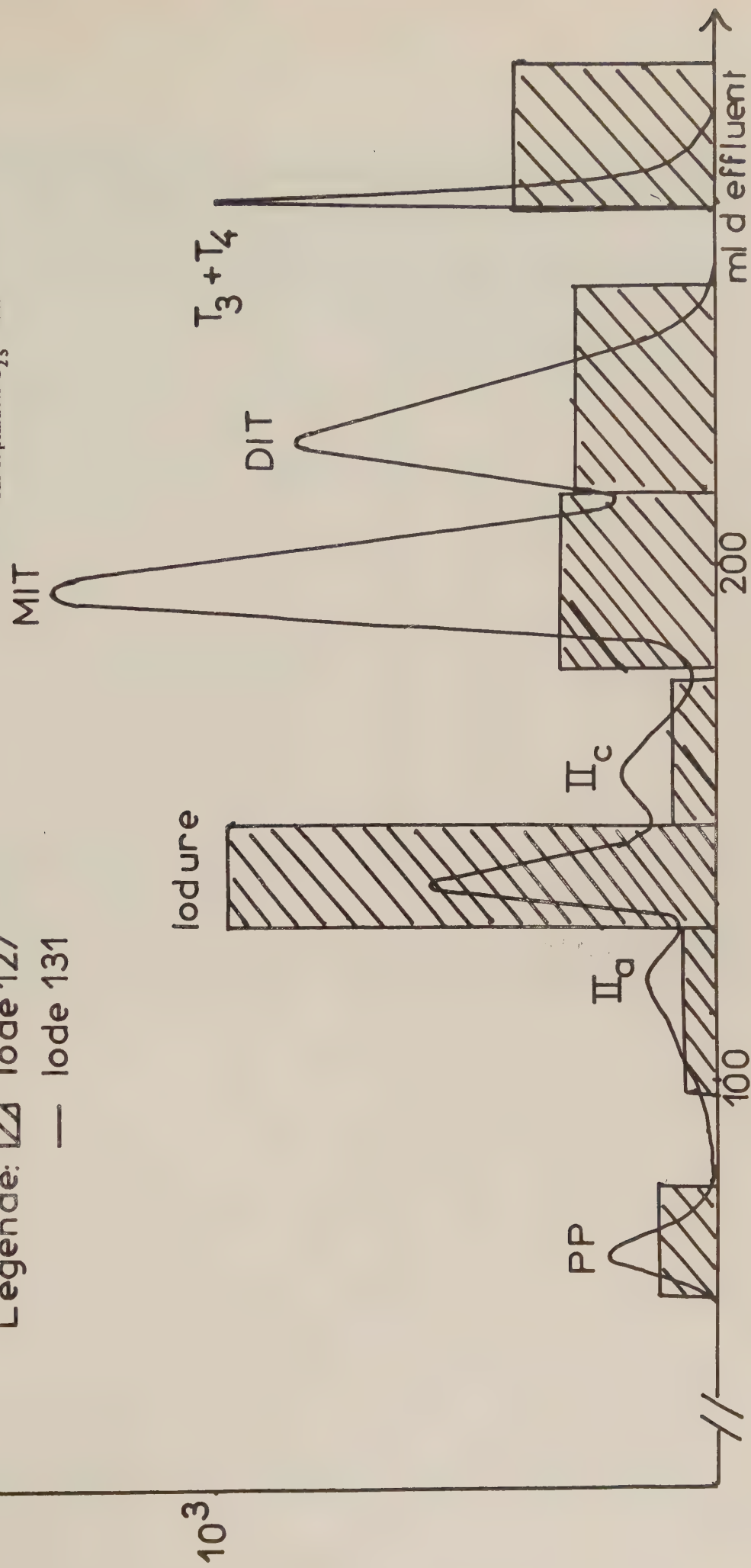


Figure n° 5

Diagramme d'élution d'un hydrolysat
thyroïdien d'extrait d'adénome toxique
sur séphadex G₂₅ "fine"

Tableau n° XIII : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les composés iodés d'hydrolysats d'extraits d'adénomes toxiques de 3 à 40 jours après son ingestion.

Cas n°	Temps entre ingestion de l'iode et intervention	Poly pepti des	IIa	Iodu re	IIc	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
11	3	6,4	1,5	5,2	3,9	25,7	25,9	31,4
14	4	4,1	2,1	9,1	1,4	39,9	25,0	18,4
4	5	5,9	6,9	6,1	0,4	38,7	19,9	22,0
2	8	2,9	1,8	6,2	3,9	28,7	30,8	25,7
6	8	5,6	7,5	5,1	5,7	34,7	20,8	20,7
11	9	6,8	1,6	5,2	3,7	21,2	25,8	35,7
15	9	7,7	3,0	5,2	2,8	30,3	18,5	32,5
13	11	3,0	2,7	5,0	1,9	27,4	28,1	31,9
5	13	1,7		11,9		39,3	15,7	31,4
4	14	6,4	7,2	6,2	3,9	38,0	19,0	19,2
3	16	5,5	3,8	11,9	5,4	23,0	27,7	22,7
9	40	7,1	3,9	8,9	4,1	17,9	23,9	34,2
10	40	6,8	3,1	5,9	3,3	23,2	20,5	37,2
Moyenne		5,4	3,7	6,7	3,3	29,8	23,2	27,9
Ecart-type de la moyenne		0,5	0,6	0,6	0,4	2,1	1,2	1,9

Tableau n° XIV : Distribution (en %) de l'iode stable dans les composés iodés d'hydrolysats d'extraits d'adénome toxiques.

Cas n°	PP	II _a	Iodure	II _c	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
1	2,5	1,2	72,6	0,9	6,1	5,1	11,6
2	2,5	2,2	15,2	3,2	21,3	23,4	32,2
3	4,3	3,4	33,2	3,9	17,6	18,7	18,9
4	4,6	3,9	60,0	4,3	13,1	7,0	7,1
5	2,1		81,2		7,0	4,1	5,5
6	6,3	5,3	38,0	6,3	21,1	14,6	8,3
7	1,4	4,1	76,7		8,1	5,2	4,5
8	5,6	2,4	9,6	3,7	22,6	28,4	27,7
9	2,1	1,1	61,9	17,0	4,9	6,4	6,6
10	2,5	2,3	65,2	1,4	9,9	8,7	11,0
11	4,4	1,3	49,1	2,5	11,2	14,5	17,0
12	0,9	0,6	70,0		9,0	6,8	12,7
13	3,0	2,1	33,3	1,8	18,9	16,8	24,2
14	3,5	1,4	46,9	1,6	21,4	12,8	12,4
15	8,5	3,9	6,0	3,1	28,8	16,8	32,9
Moyenne	3,6	2,5	47,9	3,5	14,6	12,5	15,5
Ecart-type de la moyenne	0,5	0,4	6,4	1,1	1,9	1,9	2,5

1 - 5 - 2 Fraction iode.

On observe un taux très élevé d'iode minéral stable : 47,8 en moyenne alors qu'il représente moins de 10 % dans les 40 jours qui suivent l'ingestion d'iode radioactif.

Le pourcentage d'iode trouvé après séparation de l'extrait brut, c'est-à-dire avant hydrolyse, dans les mêmes conditions, est un peu plus faible (tableau n° X), mais la différence n'est pas significative ($t_{\text{obs}} = 0,78$, $t_{0,05 ; 27} = 2,05$), ce qui exclue l'hypothèse d'une désioduration importante au cours de l'hydrolyse (tableau n° XV).

Les fractions II_a et II_c ne sont pas d'une façon générale élevées et ne semblent pas être modifiées de façon importante en fonction du temps. Il faut toutefois noter que la fraction II_c du cas n° 9 est très élevée puisqu'elle atteint 17 % et que ce malade était sous traitement à la triiodothyronine. On ne peut pas conclure sur un cas unique et en tirer une relation de cause à effet.

Tableau n° XV : Comparaison des fractions iode 127 dans l'extrait total et dans l'hydrolysats d'extraits d'adénomes toxiques (après séparation sur séphadex G ₂₅).		
Cas n°	Fraction iode dans l'extrait total (en %)	Fraction iode dans l'hydrolysats (en %)
1	68,6	72,6
2	7,1	15,2
3	21,7	33,2
4	50,1	60,0
5	74,6	81,2
6	27,2	38,0
7	74,9	76,7
8	2,4	9,6
9	67,4	61,9
10	49,3	65,2
11	37,1	49,1
12	63,4	70,0
13	29,2	33,3
14	36,7	46,9
15	0,7	6,0
Moyenne	40,7	47,9
Ecart-type de la moyenne	6,7	6,4

1 - 5 - 3 Fractions iodotyrosines et iodothyronines.

L'iode contenu dans les iodotyrosines et les iodothyronines, qui représentent la majeure partie de l'iode organifié, est de 82,1 % au premier jour. Du 3ème au 40ème jour, les taux sont très voisins, alors qu'ils ne sont que de 42,8 % à l'état d'équilibre (tableau n° XVI). Cette différence s'explique par une diminution à la fois des iodotyrosines et des iodothyronines.

Si l'on compare les pourcentages d'iodure 127 et ceux respectivement de MIT- 127 , DIT 127 , et des iodothyronines stables, on voit qu'il existe une relation linéaire entre l'augmentation de l'iodure et la diminution de ces composés (figure n° 6). Les coefficients de corrélation sont de 0,89 pour les iodothyronines, 0,90 pour DIT et 0,91 pour MIT. Ces coefficients de corrélation linéaire sont tous hautement significatifs avec $p < 0,001$. Les pentes sont à peu près identiques pour MIT et DIT et plus fortes pour T_3 - T_4 (tableau n° XVII).

Tableau n° XVI : Pourcentage de l'iode contenu sous forme d'iodotyrosines et d'iodothyronines dans les hydrolysats des extraits d'adénomes toxiques.				
Cas n°	Iode radioactif ingéré 1 jour après l'interv.	Iode radioactif ingéré de 3 à 40 jours av ^t . l'int.	Etat d'équilibre (iode stable)	
1			22,8	
2	83,9	85,2 (7 j)	76,9	
3	75,3	73,4 (16 j)	55,2	
4		{ 80,6 (5 j) 76,2 (14 j)	27,2	
5	85,2	86,4 (13 j)	16,6	
6	75,7	76,2 (8 j)	44,0	
7	84,0		17,8	
8			78,7	
9		76,0 (40 j)	17,9	
10	81,3	80,9 (40 j)	29,6	
11		{ 83,0 (3 j) 82,7 (9 j)	42,7	
12	90,5		28,5	
13		87,4 (11 j)	59,9	
14		83,3 (4 j)	46,6	
15	81,3	81,3 (9 j)	78,5	
Moyenne	82,1	80,9	42,8	
Ecart-type				
la moyenne	1,8	1,2	5,8	

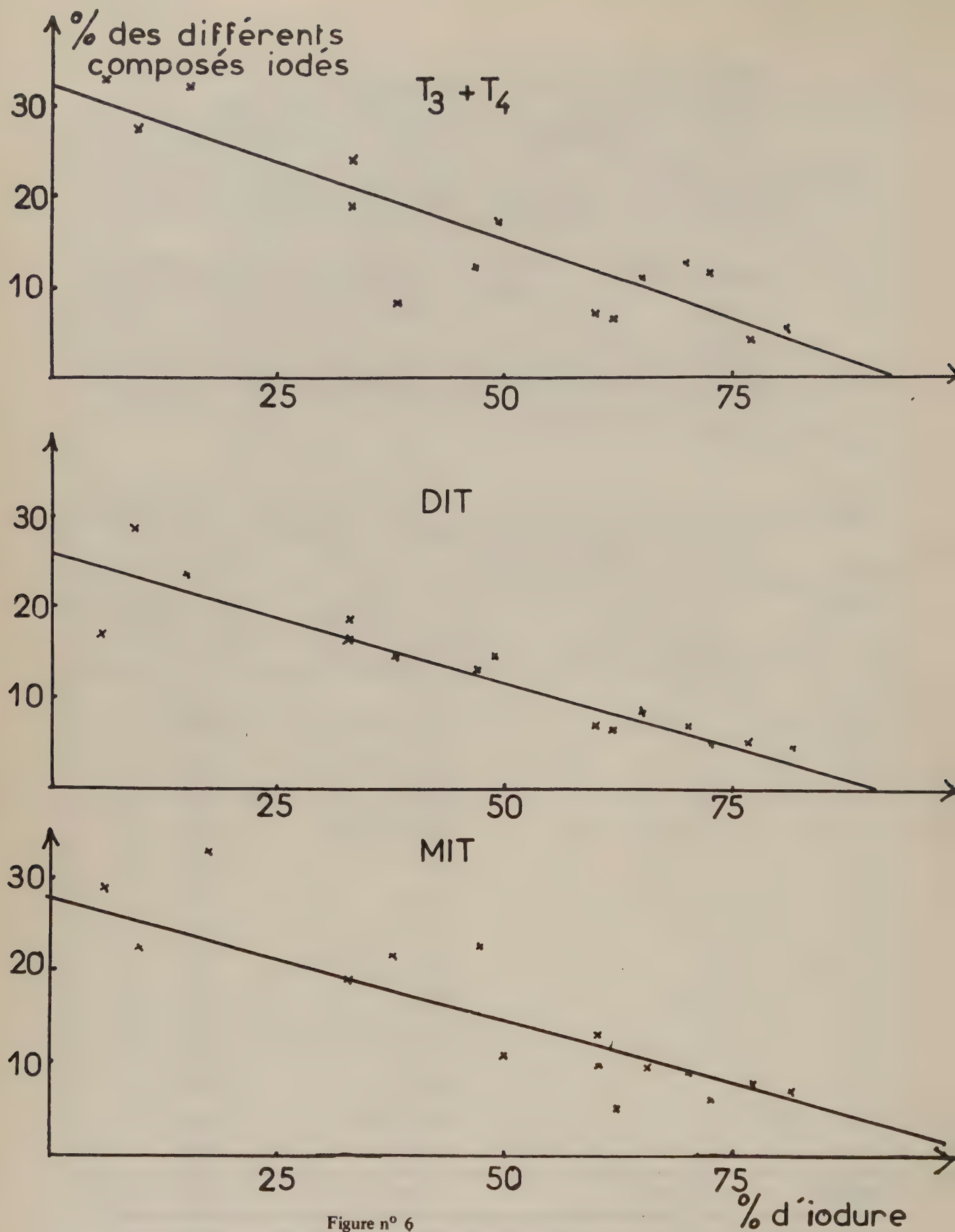


Figure n° 6
 Pourcentage des différents composés iodés stables
 en fonction du pourcentage d'iodure 127 dans les
 hydrolysats d'extraits d'adénomes toxiques après
 séparation sur séphadex G_{25}

Tableau n° XVII : Corrélation existant entre l'augmentation de la fraction iode stable et la diminution des fractions iodotyrosines et iodothyronines.			
	Coefficient de corrélation		Pente des droites
MIT- ¹²⁷ ₁	0,91		- 0,27
DIT- ¹²⁷ ₁	0,90		- 0,28
Iodothyronines- ¹²⁷ ₁	0,89		- 0,35

Nous avons exprimé les quantités relatives d'iode sous forme de MIT et DIT aux différents stades de la biosynthèse :

- D'une part, par les rapports $\frac{DIT}{MIT + DIT}$ qui représentent la proportion d'iode des iodotyrosines présente sous forme de DIT.

- D'autre part, par les rapports $\frac{MIT}{DIT}$.

Les rapports $\frac{DIT}{MIT + DIT}$ (tableau n°XVIII) se situent entre 0,28 et 0,57 avec une moyenne de 0,44 et paraissent très stables au cours du temps.

L'analyse de variance montre que les différences entre les moyennes ne sont dues qu'au hasard.

La moyenne des rapports $\frac{MIT}{DIT}$ (tableau n° XIX) située entre 1,26 et 1,63 est supérieure à celle donnée par différents auteurs chez les sujets normaux. En fait comme l'ont déjà montré d'autres auteurs, la valeur de ces rapports est fonction de la concentration en iode ¹²⁷ du tissu et surtout du taux d'iodation de la thyroglobuline. Le tableau n° XX et la figure n° 7 sont en accord avec cette théorie, et montrent que dans l'adénome, le rapport :

$$\frac{MIT-^{127}_1}{DIT-^{127}_1}$$

semble varier de manière linéaire décroissante ($r = 0,74$, $p < 0,01$).

L'analyse de variance montre également qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de signification de 5 %, entre les rapports $\frac{MIT}{DIT}$ en fonction du temps.

Figure n° 7

Répartition des rapports $\frac{\text{MIT } ^{127}\text{I}}{\text{DIT } ^{127}\text{I}}$ en fonction de la concentration en iode stable extractible des tissus

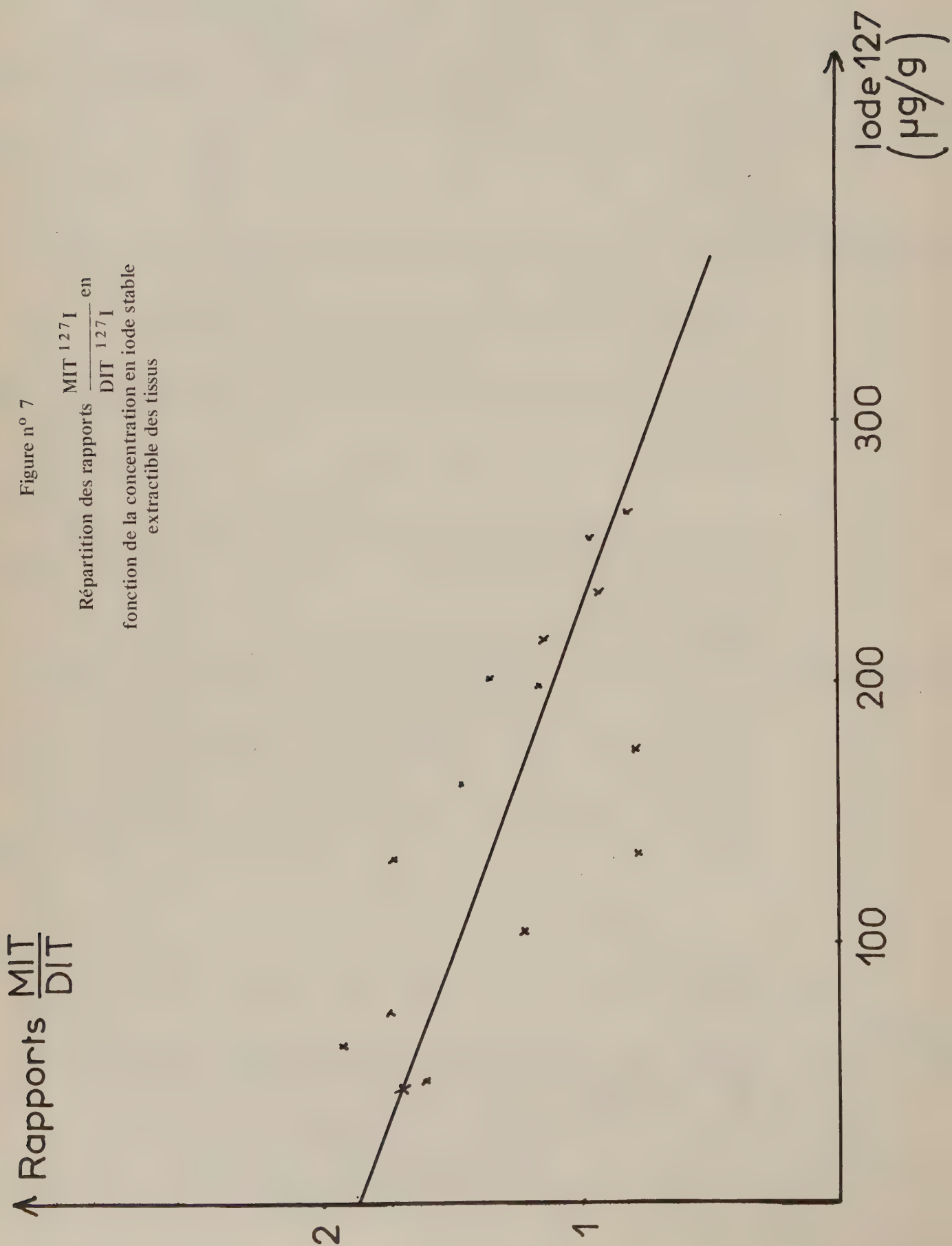


Tableau n° XVIII : Distribution de l'iode radioactif et stable dans la fraction iodotyrosine des hydrolysats des extraits d'adénomes toxiques (après séparation sur séphadex G25).

Cas n°	Rapports $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT}+\text{DIT}}$:	Rapports $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT}+\text{DIT}}$:	DIT- ¹²⁷ I
	un jour après :	3 à 40 j. après :	-----
	l'ingestion de :	l'ingestion de :	MIT- ¹²⁷ I + DIT- ¹²⁷ I
	l'iode radioact. :	l'iode radioact. :	(état d'équilibre)
1	:	:	0,46
2	0,53	0,52	0,52
3	0,43	0,55	0,52
4	:	{ 0,34	0,35
5	0,28	{ 0,33	0,37
6	0,34	0,29	0,41
7	0,39	0,37	0,39
8	:	:	0,56
9	:	0,57	0,57
10	0,78	0,47	0,47
11	:	{ 0,50	0,56
12	0,36	{ 0,55	0,43
13	:	0,51	0,47
14	:	0,39	0,37
15	0,38	0,38	0,37
Moyenne	0,44	0,44	0,45
Ecart-type de la moyenne.	0,05	0,03	0,02

Tableau n° XIX : Rapports des concentrations de l'iode contenu sous forme de MIT et DIT en fonction du temps dans 15 adénomes toxiques.

Cas n°	$\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ 1 jour après l'ingestion de l'iode radioactif.	$\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ 3 à 40 jours après l'ingestion de l'iode radioactif.	$\frac{\text{MIT-}^{127}\text{I}}{\text{DIT-}^{127}\text{I}}$ (état d'équilibre).
1			1,20
2	0,89	0,93 (8 j)	0,91
3	1,34	0,83 (16 j)	0,94
4		{ 1,94 (5 j) 2,00 (14 j)	1,87
5	2,61	2,50 (13 j)	1,71
6	1,97	1,67 (8 j)	1,45
7	1,56		1,58
8			0,80
9		0,75 (40 j)	0,76
10	1,29	1,13 (40 j)	1,14
11		{ 0,99 (3 j) 0,82 (9 j)	0,77
12	1,78		1,33
13		0,97 (11 j)	1,13
14		1,60 (4 j)	1,67
15	1,65	1,63 (9 j)	1,71
Moyenne	1,63	1,37	1,26
Ecart-type de la moyenne.	0,18	0,15	0,10

Tableau n° XX : Répartition des rapports $\frac{\text{MIT-127}}{\text{DIT-127}}$ en fonction de la concentration en iode stable extractible des tissus)

Cas n°	Concentration en ^{127}I extractible (en $\mu\text{g/g}$)	$\frac{\text{MIT-}^{127}\text{I}}{\text{DIT-}^{127}\text{I}}$
1	104	1,20
2	234	0,91
3	255	0,94
4	61	1,87
5	73	1,71
6	160	1,45
7	47	1,58
8	266	0,80
9	134	0,76
10	198	1,14
11	174	0,77
12	201	1,33
13	216	1,13
14	44	1,67
15	131	1,71

Les taux d'hormones stables sont assez dispersés dans l'adénome, se situant entre 4,5 et 32,2 %, avec une moyenne de 15,5 % (tableau n° XIV).

Le coefficient de corrélation entre les taux d'hormones et l'iode 127 extractible des glandes est significativement différent de zéro ($p < 0,02$) La droite de régression montre que ces taux augmentent avec la concentration en iode 127 (figure n° 8).

Sur la figure n° 9, on peut voir qu'il existe une relation entre le PBI sanguin et le taux d'hormones stables du tissu adénomateux ; l'étude du coefficient de corrélation linéaire montre que les variables ne sont pas indépendantes ($r = 0,74$, $p < 0,01$). Un ajustement non linéaire permet de penser que nos points se distribuent autour d'une courbe dont la fonction est du type :

$$y = \frac{x}{ax + b}$$

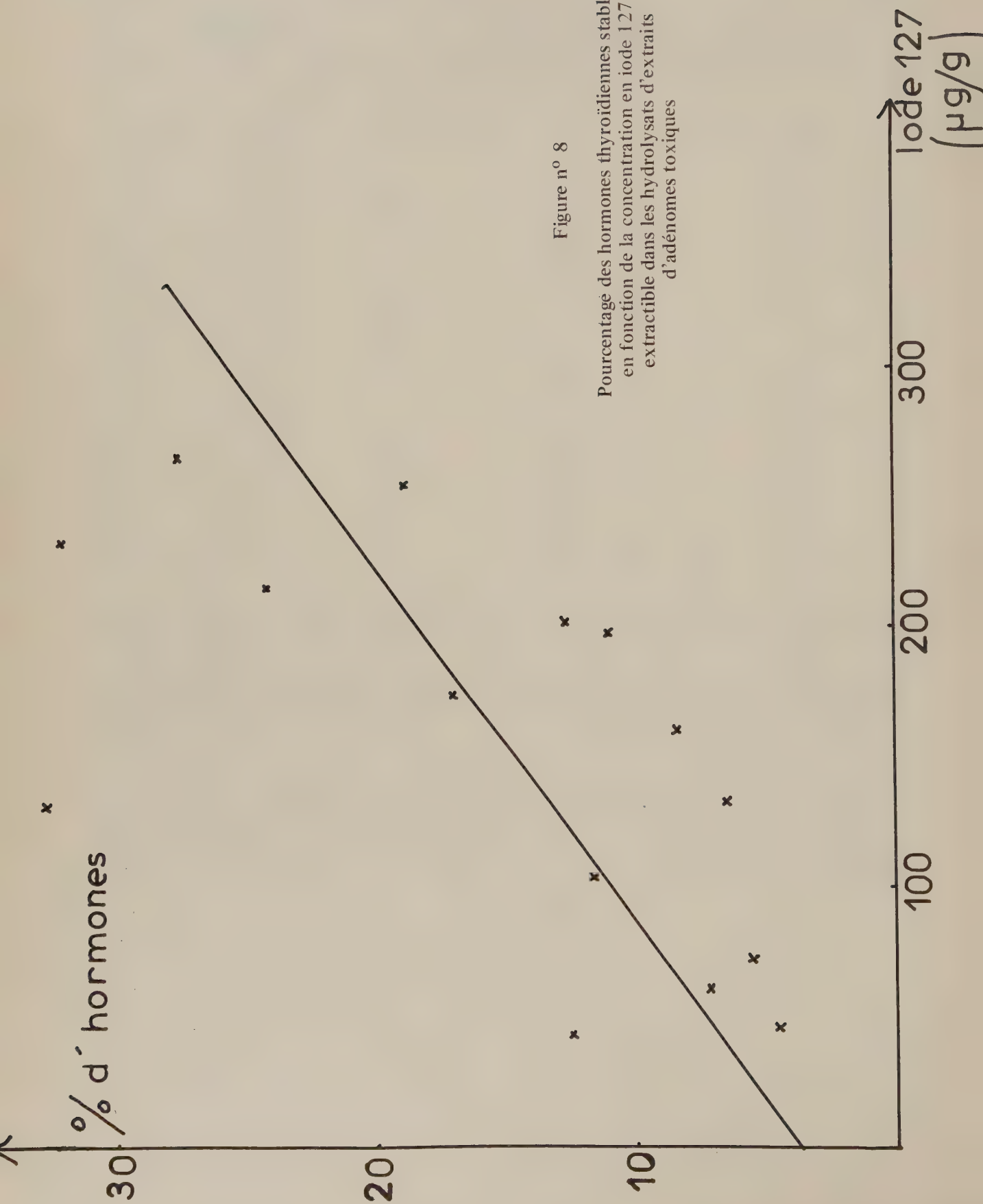


Figure n° 8

Pourcentage des hormones thyroïdiennes stables
en fonction de la concentration en iode 127
extractible dans les hydrolysats d'extraits
d'adénomes toxiques

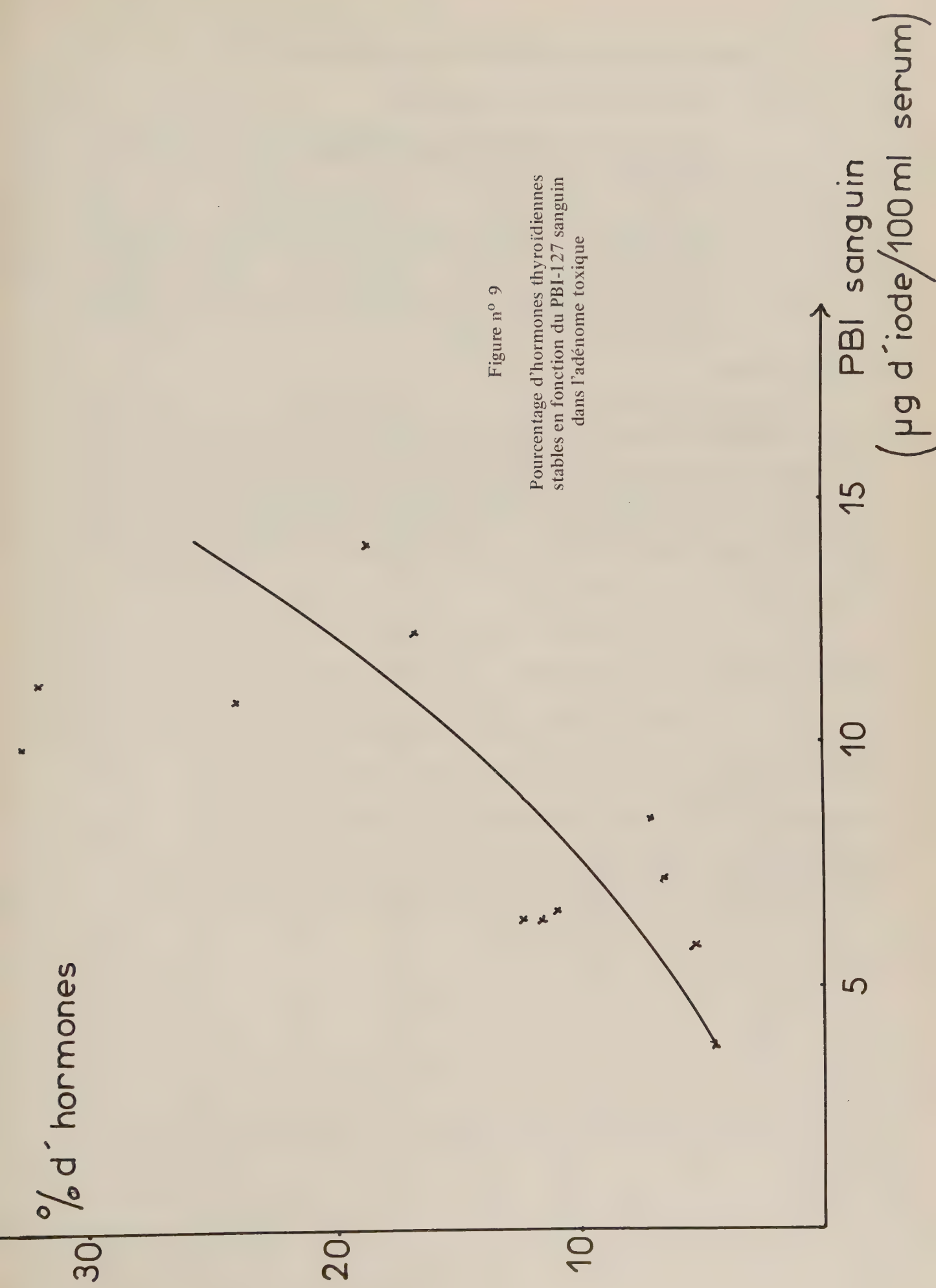


Figure n° 9

Pourcentage d'hormones thyroïdiennes
stables en fonction du PBI-127 sanguin
dans l'adénome toxique

1 - 6 Etude des activités spécifiques des composés iodés.

1 - 6 - 1 Protéines et iodure des extraits.

Ces activités spécifiques, exprimées en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g} \times 10^6$ et rapportées à 1 μCi ingéré, sont assez variables en valeur absolue d'une glande à l'autre.

Cependant, si l'on observe ces différentes valeurs pour une même glande, on constate que toutes les activités spécifiques diminuent au cours du temps (sauf en ce qui concerne l'activité spécifique des protéines iodées pour la glande n° 3 où l'activité spécifique est légèrement plus élevée au 16ème jour qu'au 1er jour) aussi bien pour les protéines iodées que pour l'iodure (tableau n° XXI).

Tableau n° XXI : Activités spécifiques de l'iodure et des protéines iodées dans les extraits totaux d'adénomes.			
Cas n°	Temps après l'ingestion d'iode radioactif (en jours)	Activité spécifique des protéines iodées (en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g} \times 10^6$)	Activité spécifique de l'iodure (en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g} \times 10^6$)
2	1	57	67
	8	10	5
3	1	65	11
	16	81	5
4	5	168	4
	14	102	3
5	1	1132	16
	13	235	4
6	1	225	7
	8	166	3
7	1	1086	55
9	40	52	1
10	1	819	37
	40	141	3
11	3	226	4
	9	125	2
12	1	1059	9
13	11	292	85
14	4	437	39
15	1	95	181
	9	80	79

1 · 6 - 2 Iodotyrosines et iodothyronines deshydrolysats.

Nous avons exprimé les activités spécifiques relatives de ces composés par rapport à l'activité spécifique de la MIT, c'est-à-dire en tenant compte des rapports

$$\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}} \quad \text{et} \quad \frac{\text{A.S. } T_3 - T_4}{\text{A.S. MIT}}$$

(Chacune des activités spécifiques est préalablement exprimée en $\mu \text{ Ci} / \mu \text{ g} \times 10^6$ et par $\mu \text{ Ci}$ ingéré).

Si l'on considère l'évolution des rapports $\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}}$ en fonction du temps, on voit que ces rapports évoluent peu et sont répartis autour d'une droite de pente 0,0046, c'est-à-dire très faible (figure n° 10). Le coefficient de corrélation n'est pas significatif ($p > 0,10$) et la pente ne diffère pas significativement de zéro, ce qui permet de penser que le rapport $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT}}$ est constant en fonction du temps, ce qui exclue la relation précurseur-produit entre MIT et DIT.

Les rapports $\frac{\text{A.S. } T_3 + T_4}{\text{A.S. MIT}}$ augmentent en fonction du temps et se répartissent autour d'une courbe d'équation $y = ax^b$ où x est le temps en jours (figure n° 11).

Si l'on considère non plus les rapports $\frac{\text{A.S. } T_3 + T_4}{\text{A.S. MIT}}$ mais les rapports $\frac{\text{A.S. } T_3 + T_4}{\text{A.S. DIT}}$, on voit que ces rapports évoluent de la même façon que les précédents, autour d'une courbe ayant même équation (figure n° 12), ce qui était prévisible, compte tenu de la constance du rapport $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT}}$ dont nous venons de parler.

MIT

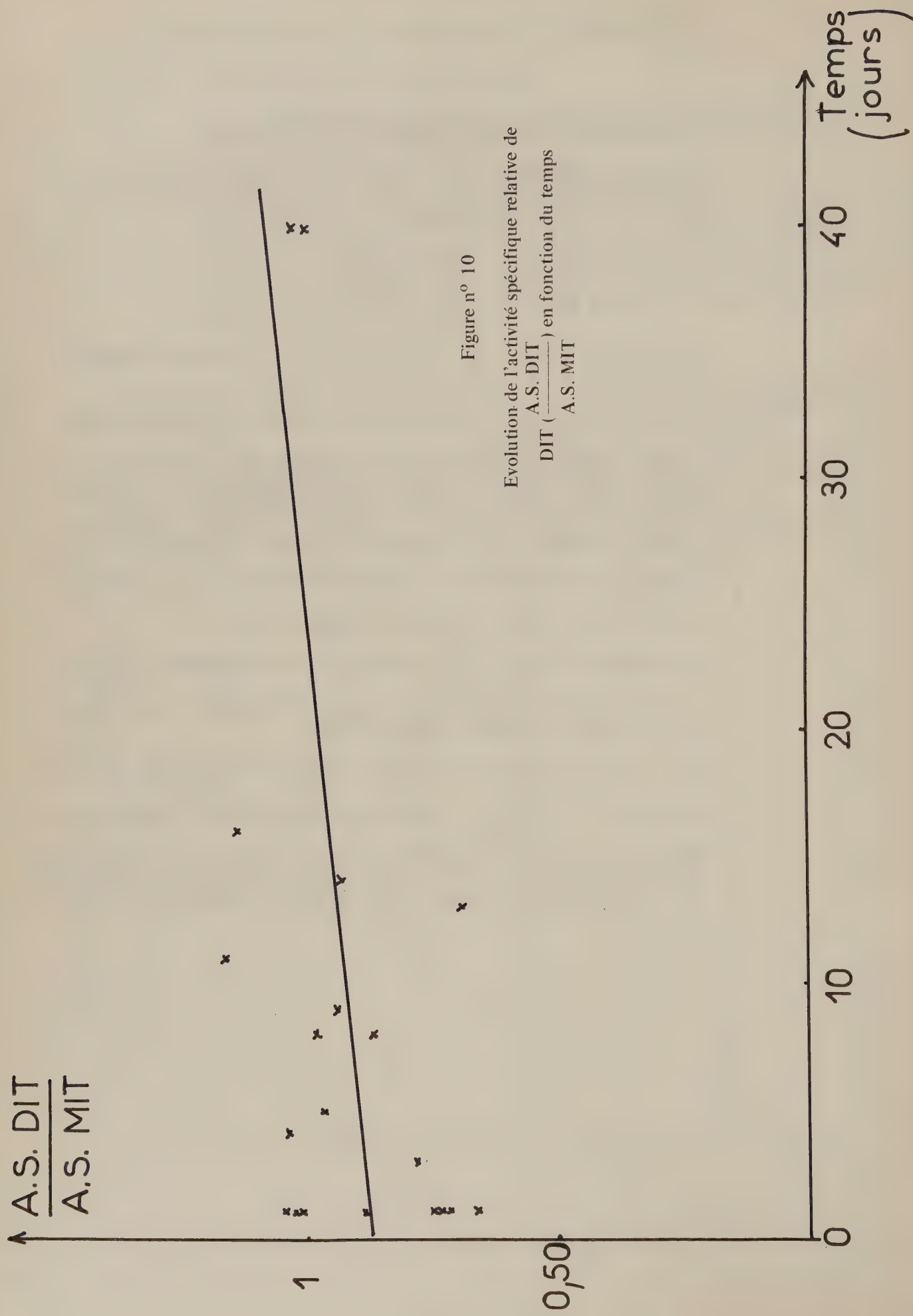


Figure n° 10

Evolution de l'activité spécifique relative de
DIT ($\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}}$) en fonction du temps

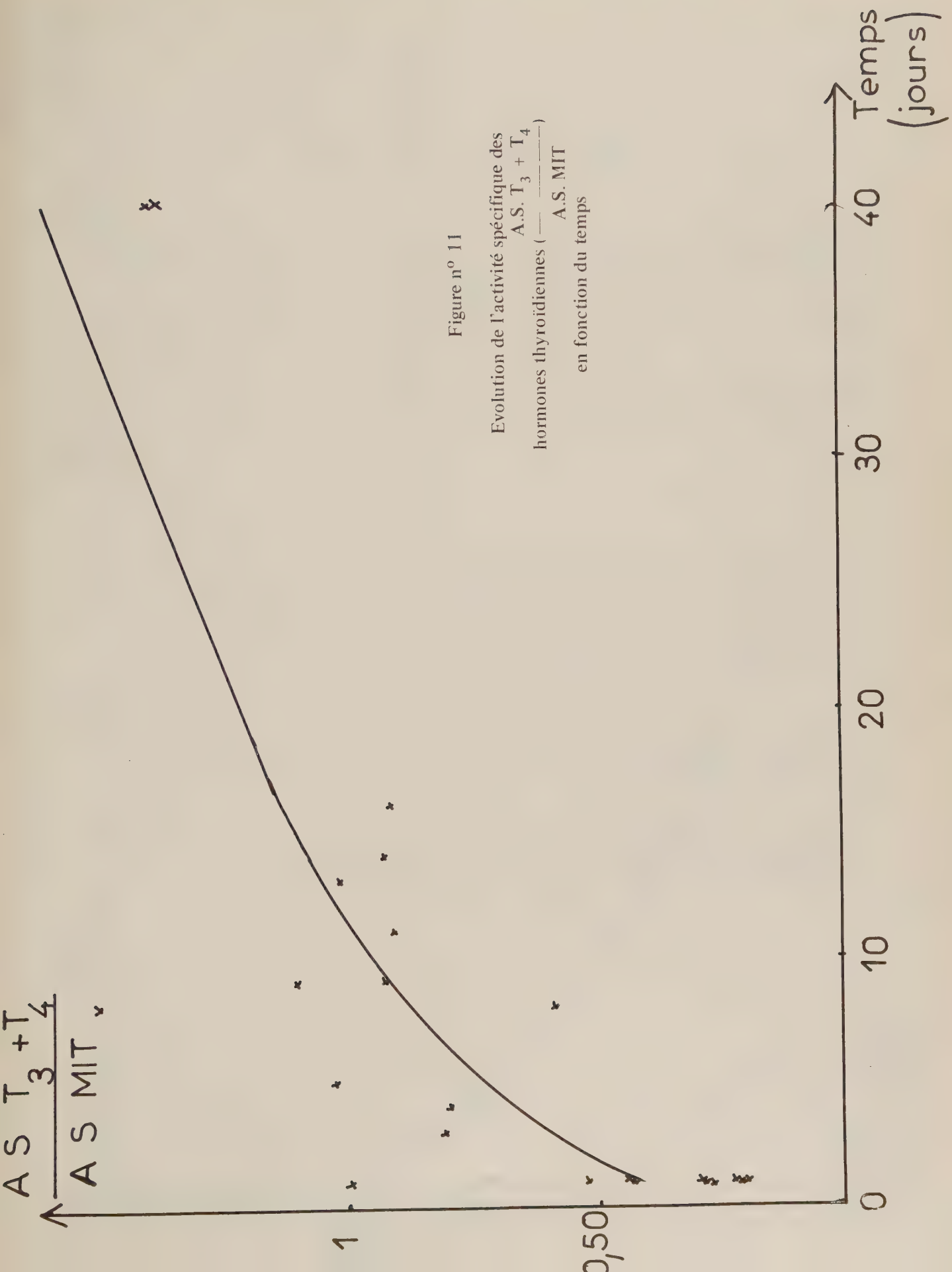


Figure n° 11

Evolution de l'activité spécifique des
hormones thyroïdiennes ($\frac{A.S. T_3 + T_4}{A.S. MIT}$)
en fonction du temps

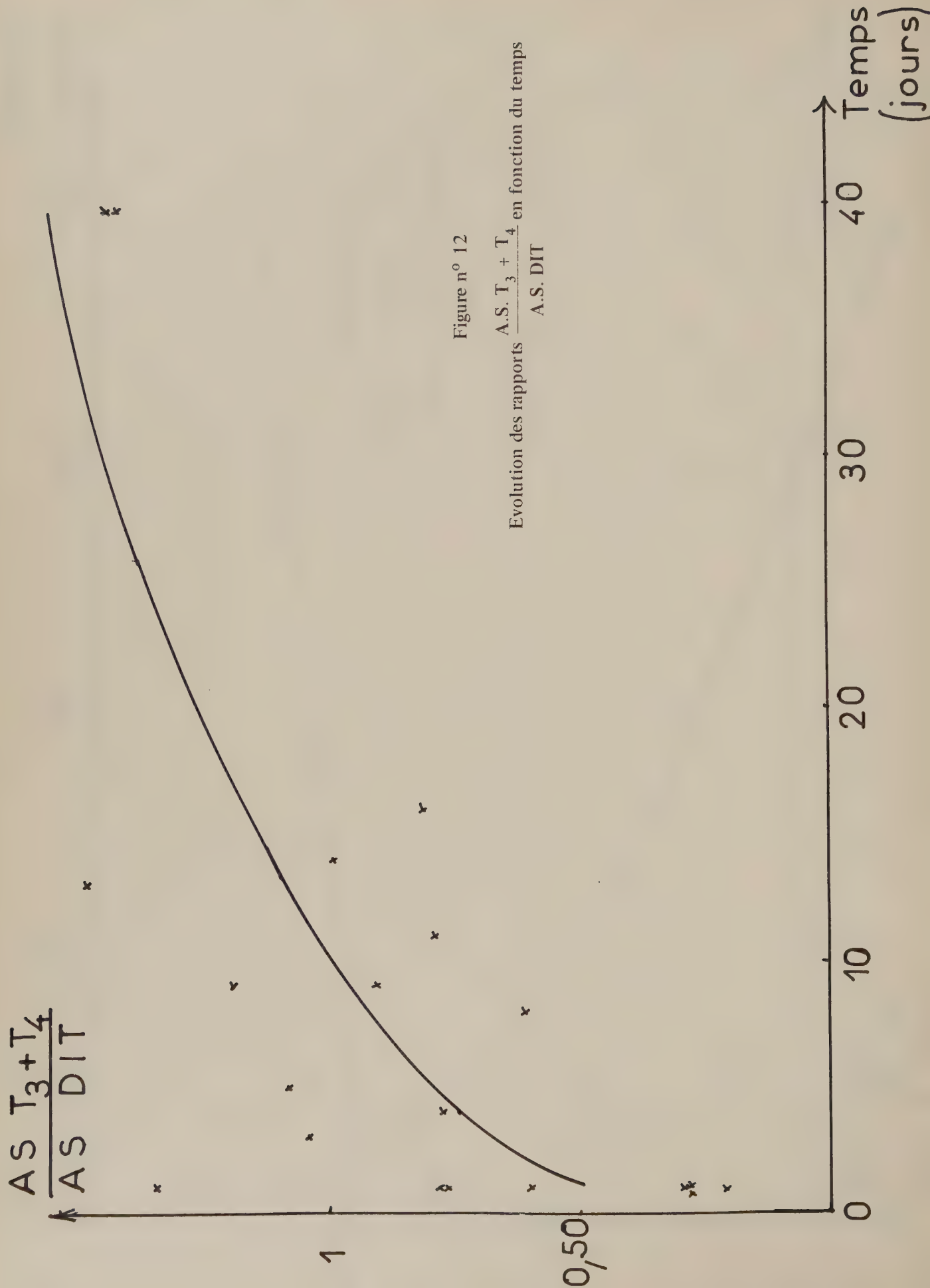


Figure n° 12

Evolution des rapports $\frac{AS \ T_3 + T_4}{AS \ DIT}$ en fonction du temps

Chapitre V

ETUDE DES TISSUS PERINODULAIRES

Nous avons pu, pour certaines glandes, étudier les tissus adjacents à l'adénome. Ces tissus étaient prélevés avec l'adénome, puis convenablement séparés de celui-ci dès le prélèvement effectué.

Nous avons procédé à l'analyse physico-chimique de ces tissus d'une manière tout à fait identique à celle des adénomes.

Les numéros d'ordre utilisés pour les tissus périnodulaires dans ce chapitre correspondent à ceux employés pour les adénomes dans le chapitre précédent.

1. RESULTATS.

1 - 1 Concentration en iode 127.

Comme dans le cas des adénomes, nous avons uniquement dosé l'iode stable extractible des 7 premières glandes étudiées. Pour les suivantes, nous avons en plus dosé l'iode stable des composés iodés non extraits qui se trouvent dans le culot de centrifugation après extraction, ce qui nous permet de connaître l'iode 127 total de ces tissus. Les résultats, exprimés en microgrammes par gramme de tissu frais, figurent dans les tableaux n° 1 et II.

Les masses d'iode sont, dans l'ensemble, faibles, avec une moyenne de 80,8 μg pour l'iode extractible, avec deux exceptions pour les cas n° 3 et surtout 8 qui présentent des taux nettement plus élevés.

Si l'on compare les résultats des 4 tissus où le dosage de l'iode a été fait dans l'extrait et dans le culot de centrifugation, on voit que les différences sont peu importantes.

<u>Tableau n° I</u> : Masses d'iode 127 extractible par gramme de tissu périnodulaire.		
Cas n°	:	Microgrammes d'iode par gramme de tissu frais
2	:	74
3	:	207
4	:	31
6	:	25
7	:	9
8	:	301
9	:	21
11	:	44
15	:	15
Moyenne	:	80,8
Ecart-type de la moyenne	:	34,3

<u>Tableau n° II</u> : Masses d'iode 127 total par gramme de tissu périnodulaire.		
8	:	332
9	:	34
11	:	49
15	:	22
Moyenne	:	109,2
Ecart-type de la moyenne	:	74,5

1 - 2 Pourcentage d'extraction de l'iode.

Ces pourcentages d'extraction ont été calculés après une extraction de 24 heures à + 4° C suivie d'un lavage, comme cela a été réalisé pour les adénomes (cf. chap. 4, § 1 - 2).

Ces résultats (tableau n° III) sont assez semblables à ceux obtenus lors de l'étude des adénomes ; le pourcentage de l'iode stable est plus faible, sans cependant qu'il y ait de différence significative au seuil de 5 % avec les autres isotopes.

<u>Tableau n° III</u> : Pourcentage d'extraction de l'iode dans le tissu périnodulaire			
Cas n°	Iode ingéré 24 h avant l'interv.	Iode ingéré de 3 à 40 j av.l'int.	Iode 127
2	95,7	95,5	
3	87,2	90,0	
4	82,9	88,5	
6	89,2	88,7	
7	89,9	88,9	
8	93,7		90,8
9	93,7	93,7	62,0
11	94,3	93,5	89,8
15	92,4	92,2	69,2
Moyenne	91,0	91,4	77,9
Ecart-type de la moyenne	1,4	0,9	7,3

1 - 3 Quantité d'iode radioactif fixé par gramme de tissu thyroïdien
frais exprimé en pourcentage de la dose ingérée.

Les calculs effectués pour obtenir ces résultats sont décrits chapitre 4 § 1 - 3. On voit immédiatement d'après les chiffres du tableau n° IV que les quantités d'iode radioactifs fixés sont très faibles, la plupart se situant aux alentours de 0,10 %. Ceci est assez logique, le tissu adjacent à l'adénome se trouvant "au repos" et n'ayant qu'une valeur fonctionnelle réduite. A signaler toutefois les valeurs plus élevées au 3ème et 5ème jour respectivement pour les cas n° 11 et 4 qui ont reçu préalablement de la TSH.

(<u>Tableau n° IV</u> : Iode radioactif fixé par le tissu périnodulaire ((exprimé en pourcentage de la dose ingérée par (gramme de tissu frais).		
Cas n°	Temps (en jour) séparant l'ingestion de l'intervent.	Pourcentage d'iode radioactif fixé par gramme de tissu frais
2	1	0,16
3	1	0,12
6	1	0,08
7	1	0,08
15	1	0,10
11	3	1,08
4	5	0,85
2	8	0,19
6	8	0,09
11	9	0,14
15	9	0,10
4	14	0,14
3	16	0,08
9	40	0,07

1 - 4 Distribution de l'iode dans les extraits.

L'analyse chromatographique des extraits des tissus périnodulaires donne une séparation des composés iodés qualitativement identique à celle obtenue avec les extraits d'adénomes, avec un pic important de protéines iodées, apparaissant pour un volume d'élu-tion correspondant au volume d'exclusion du gel, puis successive-ment les pics d'iodure, de MIT et DIT, et enfin, après changement de l'éluant, le pic des hormones.

Les résultats des tableaux V, VI, VII, montrent que l'iode radio-actif est, en presque totalité, sous forme protéique, alors que l'on voit apparaître pour l'iode stable un pourcentage assez im-portant d'iodure. Quant aux autres molécules iodées, elles n'exis-tent sous forme libre, qu'en quantité minime.

Tableau n° V : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les extraits des tissus périnodulaires 1 jour après son ingestion

Cas n°	Protéines iodées	Iodure	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
2	95,7	4,0			0,3
3	98,5	1,5			
6	98,6	1,4			
7	98,7	1,1			0,2
15	97,9	1,7			0,4
Moyenne	97,8	1,9			0,3
Ecart-type de la moyenne	0,6	0,5			

Tableau n° VI : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les extraits des tissus périnodulaires de 3 à 40 jours après son ingestion.

Cas n°	Temps entre ingestion et intervention	Protéines iodées	Iodure	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
11	3	97,4	1,3	1,0	0,2	0,1
4	5	98,4	1,5			0,1
2	8	98,5	1,2			0,3
6	8	98,4	0,9			0,6
11	9	95,6	1,9	1,3	0,9	0,3
15	9	98,8	0,6			0,6
4	14	98,2	1,6			0,2
3	16	99,2	0,6			0,2
9	40	98,6	0,7	0,4	0,15	0,15
10	40	97,4	2,4			0,2
Moyenne		98,0	1,3	0,7		
Ecart-type de la moyenne		0,3	0,2			

Tableau n° VII : Distribution (en %) de l'iode stable dans les extraits des tissus périnodulaires.

Cas n°	Protéines iodées	Iodure	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
2	93,3	6,2			0,5
3	97,8	1,2	0,4	0,3	0,2
4	74,3	22,8	1,1	0,9	0,9
6	85,0	12,4	1,1	1,2	0,3
7	72,8	16,2	4,6	4,7	1,7
8	97,5	0,8	0,5	1,0	0,2
9	76,7	20,9	0,8	0,8	0,8
11	83,4	15,4	0,6	0,3	0,3
15	93,4	1,9	1,5	2,3	0,9
Moyenne	86,0	10,9	3,1		
Ecart-type de la moyenne	3,3	2,9			

Les masses d'iode minéral stable exprimées en $\mu\text{g/g}$ de tissu frais (égales au rapport :

$$\frac{\text{masse d'iode 127 extractible/g. de tissu (tab. I)} \times \% \text{ d'iodure (tab.VII)}}{100}$$

sont situées entre 0,3 (cas n° 15) et 7,1 (cas n° 4) avec une moyenne de 3,6 (tableau n° VIII), ce qui est très inférieur à ce que l'on avait dans l'adénome (moyenne : 51,6 $\mu\text{g/g}$). On constate aussi que pour les tissus où la masse d'iode extractible est élevée (cas n° 3 et 8), les pourcentages d'iodure sont faibles, ce qui, dans une certaine mesure, uniformise les résultats.

<i>Tableau n° VIII : Masse d'iode minéral contenu par gramme de tissu frais dans les tissus périnodulaires.</i>		
Cas n°	:	Masses d'iodure 127 (en $\mu\text{g/g}$ de tissu)
2	:	4,6
3	:	2,5
4	:	7,1
6	:	3,1
7	:	1,5
8	:	2,4
9	:	4,4
11	:	6,8
15	:	0,3
Moyenne	:	3,6
Ecart-type de la moyenne	:	0,8

1 - 5 Distribution de l'iode dans les hydrolysats d'extraits.

Les diagrammes d'élution obtenus avec les hydrolysats de tissus périnodulaires sont superposables du point de vue qualitatif à ceux des hydrolysats d'adénomes. Les tableaux n° IX, X et XI rassemblent les taux des différents composés iodés séparés sur séphadex G25.

<i>Tableau n° IX</i> : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les composés iodés des hydrolysats des extraits de tissus périnodulaires, 1 jour après son ingestion								
Cas n°	P.P.	II _a	Iodure	II _c	MIT	DIT	T ₃ +T ₄	
2	3,6	4,2	9,8	2,2	40,5	35,2	4,5	
3	2,3	6,7	7,0	2,2	39,9	39,2	2,7	
7	2,1	8,1	6,5	2,7	76,8		3,8	
15	5,2	3,8	8,5	4,4	36,4	33,2	8,5	
Moyenne	3,3	5,7	8,0	3,0	39,0	36,0	5,0	
Ecart-type de la moyenne	0,7	1,0	0,7	0,5	1,3	1,8	1,3	

<i>Tableau n° X</i> : Distribution (en %) de l'iode radioactif dans les composés iodés des hydrolysats des extraits de tissus périnodulaires, 3 à 40 jours après son ingestion.								
Cas n°	Temps entre ingestion et intervention	PP	II _a	Iodure	II _c	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
11	3	1,8	5,3	3,9	1,5	62,4	18,9	6,2
4	5	0,8	4,9	3,1	1,4	72,2	11,9	5,7
2	8	4,2	4,3	6,0	2,2	43,6	30,6	9,1
11	9	2,9	5,7	5,2	2,4	49,9	21,9	12,0
15	9	7,8	1,7	4,7	1,6	33,0	26,8	24,4
4	14	0,9	5,3	3,4	1,5	68,5	13,8	6,6
3	16	4,4	7,6	6,7	3,1	33,8	35,7	8,8
9	40	3,5	2,2	4,4	1,7	52,2	14,2	21,8
Moyenne		3,3	4,6	4,7	1,9	52,0	21,7	11,8
Ecart-type de la moyenne		0,8	0,7	0,4	0,2	5,3	3,1	2,6

Tableau n° XI : Distribution (en %) de l'iode stable dans les composés iodés des hydrolysats des extraits de tissus périnodulaires.

Cas n°	PP	II _a	Iodure	II _c	MIT	DIT	T ₃ +T ₄
2	6,1	4,3	12,9	1,8	39,3	22,1	13,5
3	6,2	4,9	8,1	4,1	31,2	28,9	16,6
4	2,3	6,7	22,6	3,0	46,0	13,2	6,2
7	2,2	7,2	26,4	3,9	55,0		5,3
8	5,5	5,8	6,4	5,7	23,8	36,8	16,0
9	3,4	4,4	23,8	4,9	41,5	14,2	7,8
11	3,0	4,6	20,1	1,5	43,6	18,3	8,9
15	9,4	4,8	7,9	1,5	35,4	21,8	19,2
Moyenne	4,7	5,3	16,0	3,3	37,2	22,1	11,6
Ecart-type de la moyenne	0,9	0,4	2,9	0,6	2,9	3,1	1,9

1 - 5 - 1 Fraction non hydrolysée.

Si l'on compare les pourcentages des composés non hydrolysés des 3 tissus pour lesquels on possède les valeurs correspondant à trois étapes de la biosynthèse (cas n° 2, 3, 16), on constate une légère augmentation de ces taux en fonction du temps. Mais d'une manière générale, les valeurs ne dépassent jamais 10 % de l'ensemble des composés iodés de l'hydrolysate, quel que soit le temps de biosynthèse.

1 - 5 - 2 Fraction iodure.

On observe là aussi une augmentation de l'iodure stable par rapport à l'iodure radioactif, cette augmentation étant ici beaucoup moins importante que pour les adénomes.

Si l'on compare ces taux d'iodure stable des hydrolysats à ceux des extraits (tableau n° XII), on observe des valeurs plus élevées dans l'hydrolysate, mais la différence des moyennes n'est pas significative ($t_{\text{obs}} = 1,27$; $t_{0,05 ; 15} = 2,13$).

Tableau n° XII : Comparaison des fractions iode 127 dans l'extrait total et dans l'hydrolysate des extraits de tissus périnodulaires (après séparation sur séphadex G₂₅).

Cas n°	% fraction iode 127 dans l'extrait total.	% fraction iode 127 dans l'hydrolysate
2	6,2	12,9
3	1,2	8,1
4	22,8	22,6
6	12,4	
7	16,2	26,4
8	0,5	6,4
9	20,9	23,8
11	15,4	20,1
15	1,9	7,9
Moyenne	10,8	16,0
Ecart-type de la moyenne	2,9	2,9

1 - 5 - 3 Fractions iodotyrosines et iodothyronines.

Cette fraction d'iode organique est voisine de 80 % pour les deux isotopes radioactifs, alors qu'elle tombe à 70,6 % à l'état d'équilibre (iode 127) (tableau n° XIII) ; cette diminution est en relation avec l'augmentation de la fraction iode.

La répartition de l'iode dans les iodotyrosines (rapports $\frac{MIT}{DIT}$, $\frac{DIT}{MIT + DIT}$) est résumée dans les tableaux n° XIV et XV.

D'autre part, le tableau n° XVI et la figure n° 1 expriment la relation qui existe entre les rapports

$\frac{MIT-^{127}_1}{DIT-^{127}_1}$ et la concentration en iode 127 des tissus. La cor-

rélation est douteuse ($p \approx 0,05$ avec $r = 0,71$). L'ajustement le plus correct semble être celui de la fonction hyperbolique

$y = \frac{1}{a\rho + bx}$ (r entre $\frac{1}{y}$ et x est de $-0,94$ avec $p < 0,001$). A

noter cependant le faible nombre de points expérimentaux.

Rapports $\frac{MIT}{DIT}$

Figure n° 1

Répartition des rapports $\frac{MIT^{127}I}{DIT^{127}I}$ en
fonction de la concentration en iode stable
extractible des tissus.

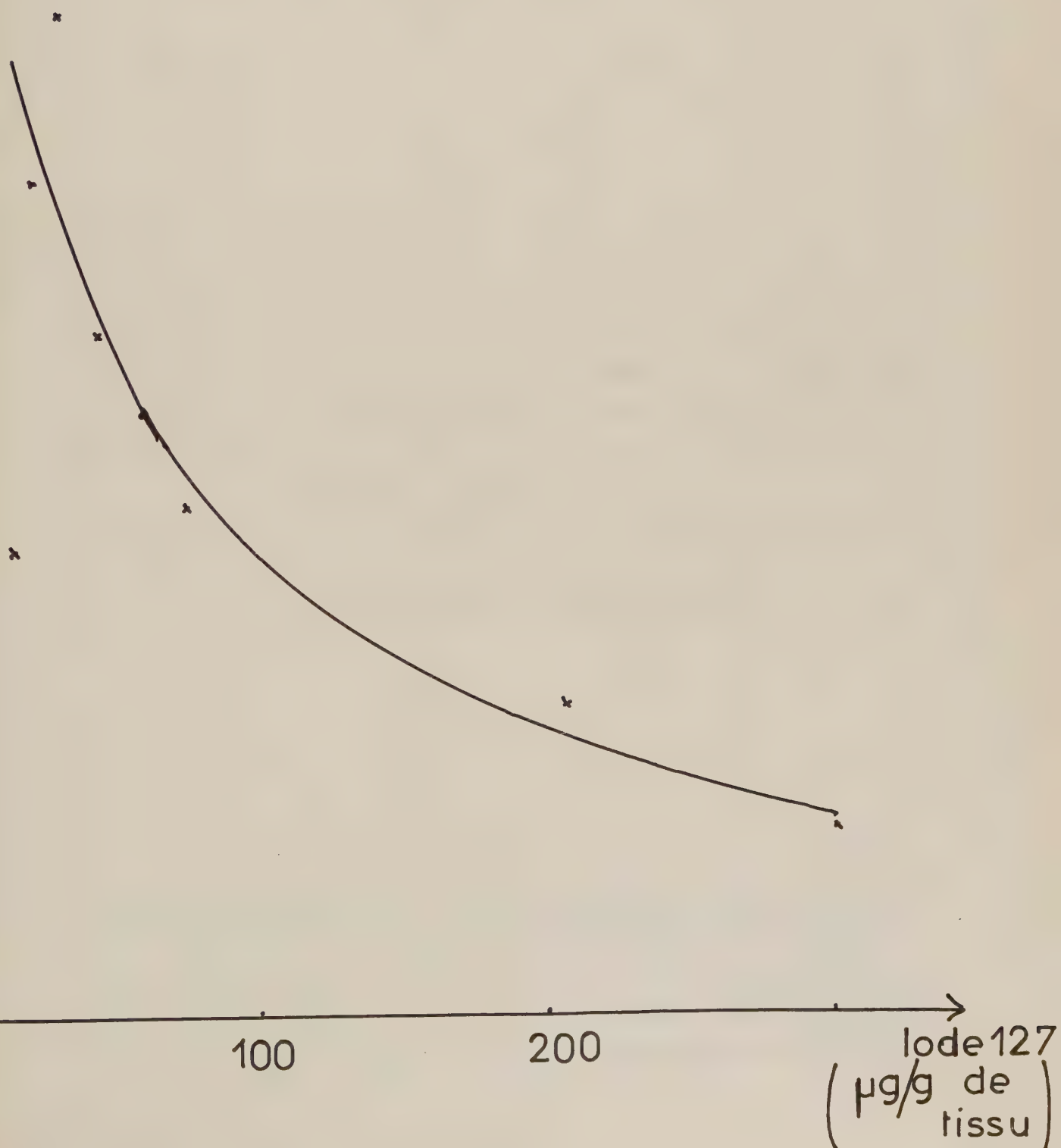


Tableau n° XIII : Pourcentage de l'iode contenu sous forme d'iodo-tyrosines et d'iodothyronines dans les hydrolysats d'extraits de tissus périnodulaires.

Cas n°	Iode ingéré 1 jour avant l'interv.	Iode ingéré 3 à 40 j av. l'interv.	Etat d'équilibre (iode stable)
2	80,2	83,3	74,9
3	81,8	78,3	76,7
4		{ 89,8 88,9	65,4
7	80,6		60,3
8			76,6
9		88,2	63,5
11		{ 87,5 83,8	70,8
15	78,1	84,2	76,4
Moyenne	80,2	85,5	70,6
Ecart-type de la moyenne	0,8	1,3	2,3

Tableau n° XIV : Distribution de l'iode radioactif et stable dans la fraction iodotyrosine des hydrolysats des extraits de tissus périnodulaires.

Cas n°	$\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$ 1 jour après l'ingestion de l'iode radioactif	$\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$ 3 à 40j après l'ingestion de l'iode radioactif	$\frac{\text{DIT-}^{127}\text{I}}{\text{MIT-}^{127}\text{I} + \text{DIT-}^{127}\text{I}}$
2	0,46	0,41	0,36
3	0,50	0,51	0,48
4		{ 0,14 0,17	0,22
8			0,61
9		0,21	0,25
11		{ 0,23 0,31	0,30
15	0,48	0,45	0,38
Moyenne	0,48	0,30	0,37
Ecart-type de la moyenne	0,01	0,05	0,05

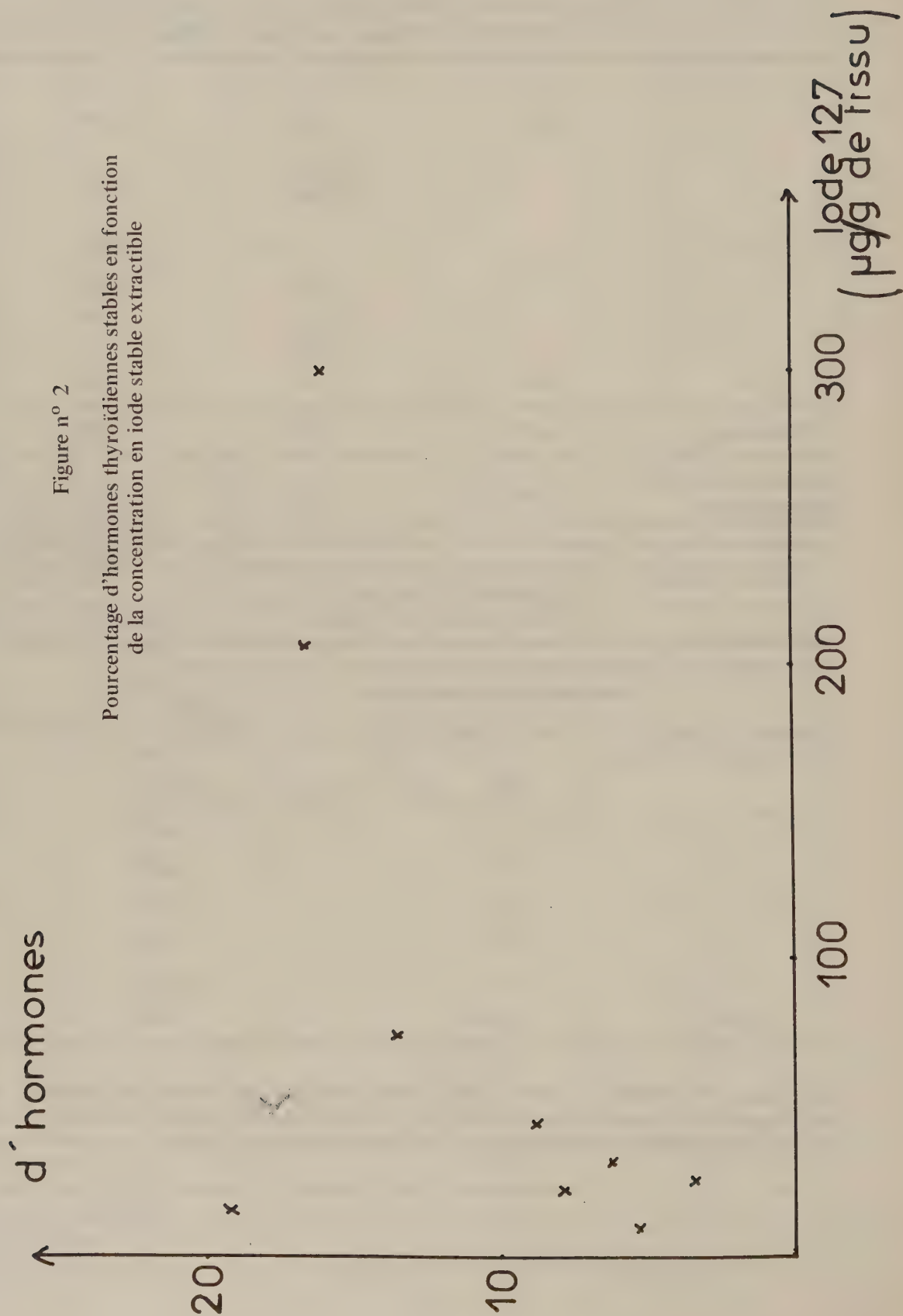
Tableau n° XV : Rapports des concentrations de l'iode contenu sous forme de MIT et DIT en fonction du temps

Cas n°	$\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ 1 jour après l'ingestion de l'iode radioactif	$\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ 3 à 40 j après l'ingestion de l'iode radioactif	$\frac{\text{MIT-}^{127}\text{I}}{\text{DIT-}^{127}\text{I}}$ (état d'équilibre)
2	1,15	1,42	1,78
3	1,02	0,95	1,08
4		{ 6,07 4,96	3,48
8			0,65
9		3,68	2,91
11		{ 3,30 2,28	2,38
15	1,10	1,23	1,62
Moyenne	1,09	2,99	1,98
Ecart-type de la moyenne	0,04	0,64	0,38

Tableau n° XVI : Répartition des rapports $\frac{\text{MIT-}^{127}\text{I}}{\text{DIT-}^{127}\text{I}}$ en fonction de la concentration en iode stable extractible des tissus.

Cas n°	Concentration en iode extractible (en µg/g)	$\frac{\text{MIT-}^{127}\text{I}}{\text{DIT-}^{127}\text{I}}$
2	74	1,78
3	207	1,08
4	31	3,48
6	25	4,65
8	301	0,65
9	21	2,91
11	44	2,38
15	15	1,62

Les taux d'hormones stables sont assez variables selon les tissus, mais la figure n° 2 montre cependant qu'il existe une relation entre ce taux et la concentration en iode 127 extractible du tissu.



1 - 6 Etude des activités spécifiques des composés iodés.

1 - 6 - 1 Protéines et iode des extraits.

Les activités spécifiques des protéines et de l'iode de chacun des extraits diminuent régulièrement avec le temps, sauf pour les protéines des tissus n° 6 et n° 2 (tableau n° XVII), le même phénomène avait été observé dans les extraits des adénomes (chapitre IV, tableau n° XX).

Tableau n° XVII : Activités spécifiques de l'iode et des protéines iodées dans les extraits de tissus périnodulaires.

Cas n°	Temps après l'ingestion de l'iode radioactif (en jours)	Activités spécifiques des protéines iodées (en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g} \times 10^6$)	Activités spécifiques de l'iode (en $\mu\text{Ci}/\mu\text{g} \times 10^6$)
2	1	15,1	9,5
	8	18,7	3,3
3	1	5,0	6,1
	16	4,1	1,9
4	5	326,3	15,8
	14	63,1	3,3
6	1	30,0	3,0
	8	40,0	2,5
7	1	67,4	3,5
9	40	43,8	1,1
11	3	249,0	17,4
	9	31,5	3,5
15	1	57,1	50,0
	9	56,8	17,0

1 - 6 - 2 Iodotyrosines et iodothyronines des hydrolysats.

Lorsqu'on exprime ces activités spécifiques en fonction de l'activité spécifique de MIT (cf. chap. IV, § 1 - 6 - 2), on peut constater (tableau n° XVIII figure n° 3), une augmentation des activités spécifiques relatives des hormones avec le temps.

Le peu de points dont nous disposons ne nous permet pas de tracer la courbe d'ajustement ; on peut voir également que les activités spécifiques relatives de ces hormones par rapport à l'activité spécifique de DIT (dernière colonne du tableau n° XVIII figure n° 4) augmentent parallèlement aux activités spécifiques relatives par rapport à l'activité spécifique de MIT. Ceci est en faveur de rapports

$$\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}}$$

constants dans le temps, ce que l'on peut pressentir en observant ces rapports (colonne 1 du même tableau), mais sans qu'on puisse apporter de preuves certaines, faute d'un nombre suffisant de sujets étudiés.

<i>Tableau n° XVIII : Activités spécifiques relatives de la diiodotyrosine et des hormones thyroïdiennes dans le tissu périnodulaire.</i>					
Cas n°	Temps après l'ingestion de l'iode radioactif (en jours)	$\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}}$	$\frac{\text{A.S. T}_3+\text{T}_4}{\text{A.S. MIT}}$		
2	1	1,54	0,33	0,21	
	8	1,25	0,60	0,48	
3	1	1,06	0,13	0,12	
	16	1,14	0,50	0,44	
4	5	0,57	0,58	1,01	
	14	0,69	0,71	1,02	
6	1	0,39	0,06	0,17	
	8	0,51	0,50	1,00	
9	40	0,79	2,25	2,83	
11	3	0,72	0,49	0,68	
	9	1,04	1,17	1,13	
15	1	1,48	0,43	0,29	
	9	1,31	1,36	1,04	

Chapitre VI

D I S C U S S I O N

1. CONCENTRATION EN IODE 127 DES TISSUS.

<u>Tableau n° I</u> : Concentration en iode 127 extractible des différents tissus étudiés.			
	µg d'iode 127 par gramme de tissu frais (moyennes)		Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	510,0		114,6
Adénome	153,2		19,5
Tissu périnodulaire	80,8		34,3

Signification des résultats.

- La différence des moyennes est significative au seuil 5 % (test de Cochran) :
 - . Entre le tissu normal et l'adénome,
 - . entre le tissu normal et le tissu périnodulaire.
- La différence n'est pas significative au seuil 5 % entre adénome et tissu périnodulaire.

<u>Tableau n° II</u> : Concentration en iode stable total des différents tissus étudiés.			
	µg d'iode 127 par gramme de tissu frais (moyennes)		Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	757,4		179,0
Adénome	215,2		30,6
Tissu périnodulaire	109,2		74,5

Signification des résultats.

La différence des moyennes est significative au seuil 5 % (test de

Cochran) entre tissu normal et adénome.

La différence des moyennes est significative au seuil 5 % (test de Student) entre tissu normal et tissu périnodulaire.

La différence des moyennes n'est pas significative au seuil 5 % (test de Student) entre adénome et tissu périnodulaire.

Nous voyons, d'après ces résultats, que les concentrations en iode stable du tissu normal sont significativement plus élevées que celles des deux autres tissus, que ce soit l'iode stable total ou extractible.

Ces chiffres d'iode 127 du tissu normal sont d'ailleurs très voisins de ceux trouvés par d'autres auteurs : 452 µg/g (15), 620 µg/g (10), 434 µg/g (6), 611 µg/g (9), 701 µg/g (27). Cependant, Salabé et collaborateurs (23) trouvent des valeurs nettement plus basses (190 µg/g) dans 5 glandes thyroïdes normales ; ces derniers auteurs trouvent également dans des nodules chauds de 6 sujets eumétaboliques une valeur moyenne de 28 µg/g, très inférieure à celles habituellement trouvées dans l'adénome toxique ; 1968 et 660 µg/g pour Wahner et coll. (27), 350-250 et 350 µg/g respectivement dans 3 adénomes toxiques pour Etling et coll. (15) 287 µg/g dans un adénome toxique (25) et une moyenne de 90 µg/g dans 9 adénomes toxiques pour Vernay (26), alors que la moyenne de nos chiffres est de 153,2 µg/g pour l'iode extractible et 215,2 µg/g pour l'iode total.

Quant à l'iode des tissus périnodulaires, bien que la moyenne paraisse plus faible que celle de l'adénome, la dispersion et le faible nombre de résultats font que la différence n'est pas significative. Les chiffres trouvés dans la littérature sont cependant du même ordre que les nôtres : 90 µg/g pour un tissu périnodulaire d'un nodule chaud (27), une moyenne de 62 µg/g pour 8 tissus périnodulaires d'adénomes toxiques (26).

2. POURCENTAGE D'EXTRACTION DE L'IODE.

<u>Tableau n° III</u> : Pourcentages d'extraction de l'iode radioactif ingéré 24 h avant l'intervention		
	: Moyenne :	: Ecart-type de la moyenne :
Adénome	: 92,2 :	: 0,9 :
Tissu périnodulaire	: 91,0 :	: 1,4 :

Signification des résultats.

La différence des moyennes n'est pas significative au seuil 5 % (test de Cochran).

Tableau n° IV : Pourcentages d'extraction de l'iode radioactif ingéré de 3 à 40 jours avant l'intervention.

	Moyenne	Ecart-type de la moyenne
Adénome	88,0	2,1
Tissu périnodulaire	91,4	0,9

Signification des résultats.

La différence des moyennes n'est pas significative au seuil 5 % (test de Cochran).

Tableau n° V : Pourcentages d'extraction de l'iode stable.

	Moyenne	Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	72,2	9,1
Adénome	81,9	3,6
Tissu périnodulaire	77,9	7,3

Signification des résultats.

Les différences de moyenne des 3 tissus ne sont pas significatives au seuil 5 % (test de Student).

De plus, il n'existe pas de différence significative entre les pourcentages d'extraction des différents isotopes de l'iode pour chacun des tissus, hormis pour les taux d'extraction de l'iode radioactif ingéré 24 heures avant l'intervention et l'iode stable dans l'adénome.

Dans sa thèse (26), Madame Vernay donne des taux moyens d'extraction de l'iode radioactif (ingéré la plupart du temps 24 heures avant l'intervention) respectivement de 83 % et 89 % pour l'adénome et les tissus périnodulaires correspondants, cette différence étant significative pour $\alpha = 0,05$. Il faut signaler que nos pourcentages d'extraction de l'iode radioactif ingéré 24 heures avant, sont comparativement plus élevés puisqu'ils sont de 92,2 % pour l'adénome et 91 % pour le tissu périnodulaire. Notre technique est légèrement différente de celle de Madame Vernay en ce qui concerne le solvant d'extraction (tampon tris-NaCl 0,14 M pH = 7 contre solution de chlorure de sodium 0,15 M), le temps de contact entre solvant et tissu (48 heures pour Madame Vernay contre 24 heures pour nous) ; enfin Madame Vernay, préalablement à l'extraction, lave les tissus avec de l'eau distillée. Il est difficile d'affirmer que ces différences de technique expliquent les écarts de nos résultats.

Salabé et collaborateurs (23) ont également trouvé un taux d'iode non extractible dans trois nodules chauds plus élevé que dans leurs tissus adjacents. De plus, ces taux sont plus élevés pour l'iode radioactif ingéré 12 jours avant l'intervention que pour l'iode ingéré 12 heures avant, ce qui est en faveur d'une augmentation de cette fraction au cours du temps. De même pour Etling (12), les protéines insolubles des tissus contiennent dans presque tous les cas un pourcentage d'iode stable beaucoup plus important que le pourcentage d'iode radioactif, dépassant parfois 50 % de la quantité d'iode stable du tissu. La moyenne de nos résultats, comme nous l'avons dit, ne montre pas de telle différence.

Dans le cas des glandes normales, les chiffres cités par d'autres auteurs pour l'extraction de l'iode radioactif absorbé 24 heures ou quelques jours avant l'intervention se situent autour de 95 % (16, 11, 10), ce qui est très proche de nos résultats.

3. QUANTITE D'IODE RADIOACTIF FIXE PAR GRAMME DE TISSU THYROIDIEN FRAIS.

Comme on pouvait le pressentir du fait de sa faible activité fonctionnelle, la quantité d'iode radioactif fixé par le tissu périnodulaire est nettement plus faible que dans l'adénome. Pour ne citer que les chiffres 24 heures après l'ingestion de l'iode, le plus élevé du tissu périnodulaire (n° II : 1,08 %) est plus faible que la valeur la plus basse trouvée dans l'adénome, les autres chiffres se situant aux alentours de 0,10 % (tableau n° IV, chapitre 5).

Nous ne pouvons comparer nos résultats à ceux des glandes normales, que nous avons étudiés uniquement en iode stable, mais Etling (11) donne chez les sujets normaux une moyenne de 3 % d'iode fixé par gramme de tissu, 24 heures après. Thomas et collaborateurs (25) donnent, pour des tissus macroscopiquement normaux, des valeurs comprises entre 0,71 et 3,3 ($\bar{m} = 2,27$) pour l'iode ingéré de 18 à 20 heures avant l'intervention, et des valeurs comprises entre 0,58 et 3,3 ($\bar{m} = 1,96$) pour l'iode ingéré de 2 à 21 jours avant. Pitt-Rivers et collaborateurs (20), trouvent des fixations d'iode ingéré de 1 à 4 jours avant l'intervention comprises entre 0,08 et 1,60 dans les tissus adjacents à des nodules non toxiques, alors que les fixations dans ceux-ci sont dans l'ensemble assez nettement plus faibles.

Nos valeurs trouvées dans l'adénome se situent entre 1,69 et 8,95 pour le premier jour avec une moyenne à 3,86 et entre 0,24 et 3,28 pour les jours suivants (entre 3 et 40 jours), avec une moyenne à 1,47 (tableau n° VI, chapitre 4).

Dans l'adénome, l'iode radioactif fixé diminue au cours du temps, la courbe d'ajustement ayant pour équation $y = \frac{1}{a + bx}$. Cependant, nous avons vu dans le chapitre 4 que pour certains tissus, l'iode radioactif se fixait lentement, signant un taux de renouvellement assez lent, alors que pour d'autres au contraire, la vitesse de renouvellement semblait élevée avec des taux d'hormones très élevés dès le premier jour de biosynthèse.

4. DISTRIBUTION DE L'IODE DANS LES EXTRAITS.

La grande majorité de l'iode radioactif se trouve sous forme protéique, puisque les taux moyens se situent entre 97 et 98 % de l'iode radioactif total, et ceci quel que soit le tissu (adénome ou tissu périnodulaire). Le reste de l'iode se trouve surtout sous forme d'iodure, les molécules organiques libres ne représentant qu'une très faible fraction de l'ensemble (de 0,2 à 0,7 %).

Par contre, la répartition de l'iode stable est très différente. Bien que l'iode protéique constitue encore la fraction principale, il ne représente plus en moyenne dans l'adénome que 58,3 % de l'iode total, la fraction iodure atteignant alors une moyenne de 40,7 % (tableau n° X, chapitre 4). Dans le tissu périnodulaire, cette fraction iodure stable est également augmentée par rapport à l'iodure radioactif, mais dans une proportion beaucoup moindre, la valeur moyenne se situant à 10 %, alors que dans les glandes normales, les taux d'iodure stable sont très faibles, la plupart inférieure à 1 %. Si l'on considère maintenant les masses d'iodure stable que représentent ces fractions, on a les résultats résumés dans le tableau suivant.

Tableau n° VI : Masses d'iodure stable libre dans les différents tissus (en µg/g de tissu frais).		
	Moyenne	Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	3,9	1,3
Adénome	51,6	9,2
Tissu périnodulaire	3,6	0,8

Signification des résultats.

- La différence des moyennes est significative au seuil 0,1 % (test de Cochran) :
 - . Entre tissu normal et adénome ;
 - . entre tissu périnodulaire et adénome.
- La différence des moyennes n'est pas significative au seuil 5 % (test de Student) entre tissu normal et tissu périnodulaire.

Ces résultats montrent que, bien que les proportions d'iodure soient très différentes dans le tissu normal et le tissu périnodulaire, les masses d'iodure libre ne sont pas statistiquement différentes dans les deux tissus. Par contre, les différences avec les masses d'iodure stable de l'adénome sont hautement significatives.

A partir de la distribution de l'iode stable dans les extraits, on peut calculer les masses d'iode sous forme protéique. Il suffit pour cela, de multiplier la masse d'iode stable extractible par le pour-

centage de l'iode stable protéique. Comme l'iode protéique correspond sensiblement à l'iode lié à la thyroglobuline, on a une assez bonne approximation de cet iode stable thyroglobulinique. Les calculs effectués sur chaque échantillon nous ont donné les résultats suivants :

<i>Tableau n° VII : Iode stable sous forme protéique.</i> (en µg/g de tissu frais)			
	: Moyenne	:	Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	: 492,8	:	111,2
Adénome	: 100,3	:	20,2
Tissu périnodulaire	: 75,8	:	33,9

Signification des résultats.

La différence des moyennes n'est pas significative au seuil 5 % (test de Student) entre adénome et tissu périnodulaire.

Les différences sont significatives au seuil 5 % (test de Cochran) entre tissu normal-adénome et entre tissu normal-tissu périnodulaire.

Ces résultats montrent que l'iode stable protéique est plus important dans les glandes thyroïdes normales que dans les deux autres tissus. Si l'on considère que cet iode protéique est très voisin de l'iode thyroglobulinique, cette différence peut s'expliquer soit par une concentration plus grande en thyroglobuline dans le tissu thyroïdien normal, soit, au contraire, par une concentration identique d'une thyroglobuline beaucoup plus iodée que dans l'adénome et le tissu périnodulaire.

Etling et coll (15) trouvent des taux d'iodation de la thyroglobuline très voisins dans cinq tissus normaux (0,07 à 0,22 %) et trois adénomes toxiques (0,13 à 0,23 %). De plus, les pourcentages d'iode radioactif fixé aux protéines précipitant entre 35 et 50 % de la saturation en sulfate d'ammonium (c'est-à-dire la thyroglobuline) sont sensiblement identiques pour les deux types de tissus (autour de 80-85 %) ; par contre les pourcentages d'iode stable lié aux protéines précipitant dans la même zone de concentration de sels, sont légèrement inférieurs dans les tissus normaux (entre 59 et 87,5 %), mais surtout présentent une différence assez nette dans les adénomes (de 18 % à 69 %), ce qui montre qu'une partie relativement élevée de l'iode stable présente dans l'extrait, ne se trouve pas dans la fraction globulinique. Ces auteurs, dans un de ces extraits, ont montré qu'une fraction importante de l'iode se trouvait dans une zone localisée en front de gradient lors de la centrifugation en gradient de densité.

Bornet, dans sa thèse (3), donne des taux de protéines de 110 et 180 mg/g de tissu pour deux glandes humaines normales. La filtration sur gel de séphadex G₂₀₀ montre respectivement que 68 % et 72,7 % de ces

protéines correspondent à la thyroglobuline, soit respectivement 74,8 mg/g et 130,8 mg/g. La même étude, réalisée sur un adénome toxique et son tissu périnodulaire, montre un taux de protéines de 66,4 mg/g dont 32,6 % de thyroglobuline (soit 21,6 mg/g) pour l'adénome, et un taux de 95,0 mg/g de protéines dont 57,7 % de thyroglobuline (soit 54,8 mg/g) pour le tissu adjacent. Dans un cas où existait une association d'un adénome autonome et d'un carcinome, le tissu adjacent contenait 57,7 mg/g de thyroglobuline contre 32,6 mg/g dans l'adénome.

De même, les travaux de Madame Vernay (26), montrent qu'il existe dans le tissu périnodulaire une concentration en thyroglobuline plus élevée que dans l'adénome (49,5 mg contre 29,1 mg), mais que cette thyroglobuline est beaucoup moins iodée, ce qui fait que les taux d'iodation sont plus forts dans l'adénome (3,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$) que dans le tissu périnodulaire (1,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$). A noter que ces taux d'iodation sont plus faibles que ceux trouvés par Salvatore et coll. (84) dans un adénome multiple folliculaire (8,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$) et dans les thyroglobulines bovines ($\bar{m} = 12,1 \mu\text{g}/\text{mg}$) et par Robbins (22) (6,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$) dans des thyroïdes bovines.

Salabé et coll. (23) donnent des concentrations moyennes de thyroglobuline en mg/g de tissu respectivement de 61,8 pour cinq tissus normaux, 65,6 pour huit nodules froids et 16 pour six nodules chauds. Pour chacun de ces types de tissu, les taux d'iodation de la thyroglobuline (exprimés en μg d'iode/mg de thyroglobuline) sont de :

- 3,07 pour les tissus normaux,
- 0,46 pour les nodules froids,
- 0,88 pour les nodules chauds.

On peut résumer tout ceci en disant :

- Que le taux de thyroglobuline est plus élevé dans le tissu normal que dans l'adénome, ce dernier tissu contenant par ailleurs moins de thyroglobuline que le tissu périnodulaire.
- Que le taux d'iodation de la thyroglobuline du tissu normal est plus élevé ou identique (15) à celui de la thyroglobuline de l'adénome toxique, celle-ci étant plus iodée que la thyroglobuline du tissu périnodulaire.

Ces résultats expliquent nos chiffres d'iode protéique de ces différents tissus.

5. DISTRIBUTION DE L'IODE DANS LES HYDROLYSATS.

Nous pouvons dire d'une façon générale, que la répartition de l'iode radioactif est différente de celle de l'iode stable. Ceci est surtout marqué pour le tissu adénomateux où le pourcentage d'iodure stable est très important, avec pour conséquence une diminution des proportions des autres composés iodés.

5 - 1 Fraction non hydrolysée.

Cette fraction correspond à des molécules dont la masse molaire est supérieure à 5 000 puisqu'elles sont exclues du gel de sépha-

dex G₂₅, mais relativement petites, car les extractions par le butanol que nous avons réalisées ont montré qu'elles étaient extraites avec un rendement supérieur à 80 %.

Dans les trois types de tissus, cette fraction est peu importante, les moyennes des différents tissus et isotopes se situant entre 2,8 et 5,4 %, ce qui correspond à ce que trouve Ermans et coll. (7) chez des sujets euthyroïdiens porteurs d'un adénome nodulaire ou diffus non toxique.

Par contre, Jones et Shultz (17) trouvent des valeurs un peu plus élevées (variant entre 4,5 et 12,2 %) dans cinq tissus thyroïdiens pathologiques différents (goître colloïde, thyroïdite, carcinome folliculaire, etc...) bien que leur technique d'hydrolyse et de séparation des composés iodés soit approximativement identique à la nôtre. Quoiqu'il en soit, cette fraction ne semble pas revêtir une importance particulière, son évolution en fonction du temps, constatée dans le tissu périnodulaire, n'étant pas significative et ne permettant pas de tirer de conclusions.

5 - 2 Fraction iodure.

<u>Tableau n° VIII</u> : Pourcentage d'iodure stable dans les hydrolysats des extraits des différents tissus étudiés.		
	: Moyenne	: Ecart-type de la moyenne
Tissu normal	: 6,6	: 0,88
Adénome	: 47,9	: 6,36
Tissu périnodulaire	: 16,0	: 2,86

Signification des résultats.

La différence des moyennes est significative :

- Au seuil de 5 % entre tissu périnodulaire et tissu normal.
- Au seuil de 0,1 % entre adénome et tissu normal
entre adénome et tissu périnodulaire.

Nous retrouvons entre les adénomes et les deux autres tissus les différences très nettes que nous avons observées pour les masses d'iodure stable des extraits. L'iodure stable représente dans l'adénome pratiquement la moitié de l'ensemble des composés iodés, ce qui est considérable, alors que dans le tissu normal, sa proportion est faible.

Ermans et coll. (10) trouvent chez onze sujets normaux, un pourcentage moyen d'iodure stable de 16,1 %, ce qui est nettement plus important que ce que l'on trouve chez nos cinq témoins, et du même ordre de grandeur que dans les tissus périnodulaires. Ermans et ses collaborateurs supposent que le pourcentage élevé provient de l'hydrolyse (pancréatine 24 heures à 37°), et que la désioda-

tion provoquée par cette hydrolyse agit plus spécialement sur les composés iodés ayant une activité spécifique faible, c'est-à-dire principalement sur les iodothyronines, ce qui permet d'expliquer la dissociation qu'ils trouvent entre les pourcentages d'iodure radioactif (7,9 %) (l'iode radioactif ayant été donné quelques heures ou quelques jours avant l'intervention) et les pourcentages d'iodure stable (16,1 %).

Si l'hydrolyse provoque bien une désiodation partielle des composés iodés (ceci est assez net pour nos tissus normaux), elle ne peut cependant expliquer les pourcentages très élevés de l'iodure dans l'adénome et le tissu périnodulaire pour deux raisons principales :

- les taux d'iodure des hydrolysats des extraits de nos tissus normaux sont très faibles, ces tissus ayant été hydrolysés de manière strictement identique aux autres ;
- les différences observées entre les taux de cette fraction dans les hydrolysats et les extraits, que ce soit pour l'adénome ou le tissu périnodulaire, ne sont pas significatives.

Dimitriadou et coll. (4) ont trouvé, après chromatographie sur papier de l'hydrolysate, révélation des taches par la réaction anhydride arsénieux-sulfate cérrique et densitométrie, des taux d'iodure stable de l'ordre de 18 % chez deux sujets normaux, 20 % dans cinq goîtres toxiques non traités et des taux variant entre 30 et 50 % dans des goîtres non toxiques. Ces auteurs ont pratiqué une hydrolyse de 8 jours par la pancréatine et l'érep-sine ce qui, si l'on tient compte des essais d'hydrolyse réalisés par d'autres auteurs (cf. première partie, chapitre 3, § 2 - 2), est un temps beaucoup trop long, qui a pour conséquence d'augmenter considérablement le phénomène de désiodation et qui peut expliquer, en partie du moins, ces résultats.

Etling (13), dans une étude sur des tissus thyroïdiens provenant d'hyperthyroïdiens traités par la solution de Lugol, trouve, chez trois sujets, des taux d'iodure stable de 6 %, 25 % et 22 %. Ces trois sujets avaient reçu la solution de Lugol jusqu'à l'intervention. Par contre, chez un malade dont la prise de Lugol avait été arrêtée 48 heures avant l'opération, ce taux d'iodure était de 67 %. Cette augmentation de l'iodure après arrêt du traitement au Lugol nous amène à bien préciser qu'aucun des malades que nous avons étudiés n'ont reçu de traitement iodé ou d'antithyroïdiens, dans la période précédant l'intervention, et que nos taux élevés d'iodure stable ne peuvent être expliqués par ce phénomène.

On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ce pourcentage élevé d'iodure stable dans l'adénome. On peut les dissocier en deux groupes :

- Les premières supposant que l'origine de cette élévation est un artéfact dû aux moyens d'étude employés.
- Les deuxièmes, tentant d'expliquer ce phénomène par des désordres métaboliques au sein de la glande thyroïde.

Les premières hypothèses portant sur les techniques d'étude employées ont été en partie réfutées pour l'hydrolyse, puisque les proportions d'iode stable ne sont pas statistiquement plus fortes dans les hydrolysats que dans les extraits. D'autre part, les méthodes d'extraction sont des méthodes douces, largement utilisées, et qui ne provoquent pas de déshalogénéation importante des composés iodés thyroïdiens ; nos résultats obtenus sur les glandes normales le prouvent d'ailleurs. Il faudrait alors imaginer que les molécules iodées de l'adénome sont particulièrement fragiles par suite d'un défaut de structure, mais rien ne le prouve.

La deuxième série d'hypothèses implique des désordres métaboliques. L'accumulation d'iode minéral dans la glande peut avoir deux origines :

- L'iode absorbé, fixé dans la glande, n'est pas organifié.
- L'iode libéré des molécules organiques thyroïdiennes par les déshalogénases n'est pas repris dans le cycle de biosynthèse ou éliminé, mais stocké dans un compartiment.

Que l'iode ne soit pas incorporé dans les molécules organiques, comme on le voit dans certains goîtres ou chez les animaux traités par les antithyroïdiens, n'est pas concevable ici, puisque l'iode radioactif, ingéré sous forme d'iode, est bien incorporé dans les composés iodés thyroïdiens, comme le montrent nos résultats.

Reste la deuxième hypothèse impliquant l'accumulation de l'iode libéré dans la thyroïde par la déshalogénéation des iodotyrosines et peut-être d'une partie des iodothyronines. Si une proportion importante de cet iode n'est pas réutilisée et s'accumule ainsi, son activité spécifique, après ingestion d'iode radioactif, doit augmenter au cours du temps. Les résultats du tableau n° XXI du chapitre 4, montrent au contraire une baisse de l'activité spécifique de l'iode pendant les intervalles de temps étudiés. Ceci n'est cependant pas en contradiction formelle avec l'hypothèse d'un stockage de l'iode en fin de cycle. Il suffit pour cela que la quantité d'iode pénétrant chaque jour dans le compartiment de stockage soit très petite par rapport à l'iode total intrathyroïdien, et que le compartiment ait une constante de sortie très faible sinon nulle. A ce moment les quantités d'iode sont suffisamment minimales pour ne pas permettre au traceur de marquer le stock important d'iode stable qui s'est accumulé à la longue d'une façon notable.

5 - 3 Fractions iodotyrosines et iodothyronines.

Les quantités d'iode sous forme d'iodotyrosines et d'iodothyronines (exprimées en pourcentage de l'iode total) représentent dans l'adénome 82,1 % de l'iode ingéré 24 heures avant l'intervention, 80,3 % de l'iode ingéré de 3 à 40 jours avant, ce qui correspond à des chiffres pratiquement égaux. Ces chiffres sont du même ordre de grandeur que ceux des tissus périnodulaires (respectivement 80,2 et 85,5 %), et que ceux trouvés chez le sujet normal par Ermans et collaborateurs (10) (86 % pour l'iode ingéré de 2 à 23

heures avant et 87 % pour l'iode ingéré de 16 à 124 heures avant). Par contre on ne trouve plus que 42,8 % de l'iode stable contre 70,6 % dans le tissu périnodulaire et 77,5 % dans le tissu normal. Ermans, toujours chez le sujet normal, trouve également un pourcentage proche puisqu'il est de 74 %. Nous verrons plus loin comment se répartit l'iode stable dans ces diverses molécules, mais on voit dès maintenant la différence importante qui existe entre l'iode stable organique dans l'adénome et les tissus périnodulaires et normaux.

Les moyennes des rapports $\frac{MIT}{DIT}$ sont supérieures à l'unité, quelque soit le tissu considéré. Les résultats récapitulatifs sont portés dans le tableau IX.

Tableau n° IX : Rapports de l'iode contenu sous forme de MIT et de DIT, (rapports $\frac{MIT}{DIT}$) dans les différents tissus étudiés.							
	: Iode ingéré 24 heures avant l'intervention.		: Iode ingéré de 3 à 40 j. avant l'intervention.		: Iode stable		
	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.	
(Tissu normal)							
(mal)					1,18	0,16	
(Adénomes)	1,63	0,18	1,37	0,15	1,26	0,10	
(Tissus périnodulaires)							
(res)	1,09	0,04	2,99	0,66	1,98	0,38	

Signification des résultats.

Les différences des moyennes des rapports $\frac{MIT}{DIT}$ de l'adénome et du tissu périnodulaire sont significatives au seuil 5 % (test de Cochran), pour l'iode radioactif, qu'il soit ingéré 24 heures ou de 3 à 40 jours avant l'intervention.

Par contre, les différences des moyennes ne sont pas significatives entre les trois tissus pour l'iode stable (test de Cochran).

On sait actuellement que la valeur de ces rapports $\frac{MIT}{DIT}$ est en relation avec la concentration en iode stable des tissus. Si les courbes des rapports $\frac{MIT-127}{DIT-127}$ en fonction de la concentration en iode stable des tissus n'est pas tout à fait similaire dans l'adénome et le tissu périnodulaire (droite décroissante dans l'adénome,

hyperbole dans le tissu périnodulaire), le fait important est que toutes deux sont des fonctions décroissantes de l'iode, ce qui est en accord avec les travaux d'autres auteurs (2, 9, 7, 27, 5, 8). Il semble que la distribution de l'iode soit le reflet du taux d'iodation de la thyroglobuline.

La variation de ces rapports $\frac{MIT}{DIT}$ en fonction du temps dans l'adé-
nome n'est pas significative au seuil 5 %. Cette constance des rapports dans le temps est, semble-t-il, un fait actuellement acquis, de nombreux auteurs ayant trouvé ces mêmes résultats dans les tissus thyroïdiens très divers (2, 21, 8, 16). Pour Bois et Larsson (2), qui obtiennent des résultats identiques chez le rat avec de l'iode radioactif administré de 30 minutes à 7 jours avant l'étude, cette constance des rapports est un argument en faveur de la synthèse de DIT à partir de MIT, car la formation de DIT à partir de la tyrosine non iodée aurait comme conséquence une diminution des rapports $\frac{MIT}{DIT}$ en fonction du temps.

Cette affirmation est discutable et les résultats que nous avons sur les activités spécifiques des iodotyrosines en fonction du temps montrent des rapports $\frac{A.S. \cdot DIT}{A.S. \cdot MIT}$ pratiquement constants dès le premier jour après l'ingestion de l'iode radioactif. Des résultats identiques sont d'ailleurs trouvés dans le goître simple non toxique (8, 6, 9) et les glandes normales (6, 10). Ceci peut-être en faveur de l'indépendance entre l'iodation de la MIT et de la DIT, encore que certains auteurs (21, 1) estiment que ce n'est pas un critère absolu. Plaskett (21) propose, pour expliquer les rapports $\frac{MIT}{DIT}$ constants, un schéma de biosynthèse comportant deux compartiments protéiques, l'un à renouvellement très rapide ne contenant que des iodotyrosines, l'autre à renouvellement lent, qui recevrait du premier compartiment, les iodotyrosines d'activités spécifiques identiques et qui poursuivrait la biosynthèse jusqu'aux iodothyronines.

Si l'on exprime, par les rapports $\frac{DIT}{MIT + DIT}$, la fraction d'iode contenue dans les iodotyrosines sous forme de DIT, on obtient les résultats suivants :

Tableau n° X : Rapports de l'iode contenu sous forme de DIT et d'iodotyrosines (rapports $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$) dans les différents tissus étudiés.

	Iode ingéré 24 heures avant l'intervention.		Iode ingéré de 3 à 40 j. avant l'intervention.		Iode stable	
	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.	Moyenne	Ecart-type de la moyenne.
Tissu normal					0,47	0,04
(Adénomes	0,44	0,05	0,44	0,03	0,45	0,02
Tissus périnodulaires.	0,48	0,01	0,30	0,05	0,37	0,05

Signification des résultats.

La différence des moyennes pour l'iode radioactif ingéré 24 heures avant l'intervention n'est pas significative entre adénome et tissu périnodulaire (test de Cochran).

La différence des moyennes pour l'iode radioactif ingéré de 3 à 40 jours avant est significative au seuil 5 % entre adénome et tissu périnodulaire (test de Student).

Les différences des moyennes de l'iode stable ne sont pas significatives pour les trois tissus (test de Student).

Ermans (10) trouve chez 11 sujets normaux des rapports respectivement de 0,54, 0,55 et 0,53 pour l'iode ingéré entre 2 et 23 heures avant l'intervention, entre 16 et 124 heures et l'iode stable. De même, chez 6 autres sujets normaux et 12 des 23 sujets goitreux étudiés (6), il trouve des rapports supérieurs aux nôtres ($\bar{m} = 0,52$). Par contre dans les 11 autres goîtres, la valeur moyenne est de 0,28. Pour ces auteurs, les rapports $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$ inférieurs à 0,40 sont observés pour les glandes dont le poids est augmenté (210 grammes contre 70), où la concentration en iode est diminuée (116 $\mu\text{g/g}$ contre 295), et où l'examen histologique révèle une augmentation de volume des follicules et de grandes quantités de colloïde ; pour eux, ces rapports reflètent une modification locale et non une anomalie générale du tissu thyroïdien. Dans un autre article (9), Ermans trouve des rapports $\frac{\text{DIT}}{\text{MIT} + \text{DIT}}$ plus faibles dans les nodules non toxiques que dans les tissus adjacents, et il semble que la valeur de ces rapports soit fonction du taux d'iode de la glande et ne soit pas spécifique d'un type de goître

mais représente une forme commune du comportement de la glande thyroïde humaine.

Nous avons vu précédemment que les rapports des activités spécifiques de la DIT et de la MIT n'évoluent pas dans l'adénome de façon significative en fonction du temps. Ceci n'est ni contraire à l'hypothèse d'une relation directe précurseur-produit admise par certains auteurs (2, 23, 18, 19), ni à celle d'une iodation indépendante des deux molécules d'iodotyrosines (6,8).

Si l'on considère maintenant les rapports $\frac{\text{A.S. iodothyronines}}{\text{A.S. MIT}}$ et $\frac{\text{A.S. iodothyronines}}{\text{A.S. DIT}}$, toujours dans l'adénome, on voit qu'ils augmentent au cours du temps de façon parallèle, selon une courbe d'ajustement dont l'équation est du type $y = ax^b$. Cette courbe croise la droite représentant les rapports $\frac{\text{A.S. DIT}}{\text{A.S. MIT}}$ entre 10 et 11 jours. Ermans et coll. (6) montrent des rapports $\frac{\text{A.S. T}_4}{\text{A.S. DIT}}$ augmentant selon une droite pour atteindre l'unité aux environs de 30 jours, c'est-à-dire nettement plus tard que dans l'adénome (10 jours). Cette augmentation des rapports se fait d'ailleurs de manière semblable dans le goître simple et le tissu normal. Ces résultats sont confirmés dans un autre article de cet auteur (9). Dans une publication plus récente concernant l'étude du tissu normal (10), les rapports $\frac{\text{A.S. T}_4}{\text{A.S. MIT}}$ atteignent au 5ème jour des valeurs comprises entre 0,20 et 0,36, c'est-à-dire plus faibles que les nôtres (0,74).

Ceci semble donc signifier que la biosynthèse hormonale est plus rapide dans les adénomes, et pourrait expliquer les pourcentages plus élevés de l'iode hormonal correspondant à l'iode ingéré entre 3 et 40 jours que l'iode hormonal stable (tableau n° XIII, chapitre 4).

Quant aux molécules stables, l'augmentation du pourcentage de l'iodure-127 dans l'adénome a pour conséquence la diminution parallèle de l'iode sous forme organique. Si l'on exprime ces molécules organiques par leur contenu en iode stable (exprimé en microgrammes d'iode stable par gramme de tissu frais), on obtient les résultats résumés dans les tableaux suivants.

Tableau n° XI : Iode stable sous forme de MIT dans les différents tissus étudiés. (Résultats en µg/g de tissu frais).			
	: Moyenne	: Ecart-type de la moyenne	
Tissu normal	: 136,3	: 28,6	
Adénome	: 24,2	: 4,8	
Tissu périnodulaire	: 30,4	: 10,2	

Signification des résultats.

Les différences des moyennes sont significatives au seuil 5 % entre le tissu normal et les deux autres tissus (adénome et tissu périnodulaire (test de Cochran).

Par contre, la différence n'est pas significative entre adénome et tissu périnodulaire (test de Student).

<u>Tableau n° XII</u> : Iode stable sous forme de DIT dans les différents tissus étudiés (Résultats en µg/g de tissu frais).		
	: Moyenne :	: Ecart-type de la moyenne :
Tissu normal	: 130,8 :	: 36,1 :
Adénome	: 23,0 :	: 5,6 :
Tissu périnodulaire	: 29,4 :	: 15,6 :

Signification des résultats.

Identique à la précédente, c'est-à-dire différence significative au seuil 5 % entre tissu normal et adénome et tissu périnodulaire. (Test de Cochran).

<u>Tableau n° XIII</u> : Iode stable sous forme d'iodothyronines dans les différents tissus étudiés (Résultats en µg/g de tissu frais).		
	: Moyenne :	: Ecart-type de la moyenne. :
Tissu normal	: 153,8 :	: 28,4 :
Adénome	: 27,9 :	: 6,5 :
Tissu périnodulaire	: 12,9 :	: 6,4 :

Signification des résultats.

La différence est significative pour $\alpha = 0,05$ entre le tissu normal et l'adénome et significative pour $\alpha = 0,01$ entre le tissu normal et le tissu périnodulaire alors qu'elle n'est pas significative entre adénome et tissu périnodulaire.

Ces résultats montrent que l'iode stable sous forme de MIT, DIT et iodothyronines est significativement plus élevé dans le tissu normal que dans les deux autres tissus étudiés, alors que dans ces derniers (adénome et tissu périnodulaire) les taux sont très voisins.

On peut remarquer aussi que pour chaque type de tissu, la concentration en iode stable des trois molécules est à peu près identique, sauf pour le tissu périnodulaire où l'iode stable des iodothyronines est plus faible.

Les valeurs obtenues pour les hormones des sujets normaux sont par ailleurs très proches de celles trouvées par Ermans et collaborateurs (9) qui sont de 165 ± 40 $\mu\text{g/g}$ alors que les valeurs dans les goîtres simples se situent à 37 ± 9 $\mu\text{g/g}$.

Si, à partir de ces chiffres, on calcule le nombre moyen de molécules-gramme de chacun des composés par gramme de tissu, on obtient les résultats du tableau n° XIV (pour les hormones, nous avons fait le calcul en supposant que nous n'avions que de la thyroxine, ce qui entache le résultat d'une certaine erreur).

<u>Tableau n° XIV</u> : Nombre moyen de molécules-gramme de MIT, DIT et T ₄ par gramme de tissu thyroïdien						
	:	MIT	:	DIT	:	T ₄
Tissu normal	:	1,07	:	0,51	:	0,30
Adénome	:	0,19	:	0,09	:	0,06
Tissu périnodulaire	:	0,23	:	0,06	:	0,03

Si l'on fait, pour chaque composé, les rapports du nombre de molécules dans le tissu normal au nombre de molécules dans l'adénome d'une part, et dans le tissu périnodulaire d'autre part, on a les résultats suivants :

$$\begin{aligned}
 \text{MIT} : \frac{\text{Tissu normal}}{\text{Adénome}} &= 5,6 & ; & \quad \frac{\text{tissu normal}}{\text{tissu périnodulaire}} = 4,6 \\
 \text{DIT} : & " & = 5,6 & ; & " & = 8,8 \\
 \text{T}_4 : & " & = 5,4 & ; & " & = 12
 \end{aligned}$$

Ainsi, on a 5 fois plus de MIT, DIT et T₄ dans le tissu thyroïdien normal que dans l'adénome, alors que si ce rapport est encore respecté pour la MIT entre tissus normal et périnodulaire, on a près de 9 fois plus de DIT et 12 fois plus de T₄ dans le tissu normal que dans le tissu périnodulaire. Ceci semblerait montrer que la synthèse hormonale se fait qualitativement bien dans l'adénome, mais de façon moins intense que dans le tissu thyroïdien normal, alors que pour le tissu périnodulaire, le déficit s'accroît au fur et à mesure que l'on progresse dans la biosynthèse.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BARNABY C.F., DAVIDSON A.M., PLASKETT L.G.
Intrathyroïdal iodine metabolism in the rat
Biochem. J. 1965, 95, 811-818.
- 2 - BOIS I., LARSSON L.G.
Effect of varying iodine supply on labelled iodine fractions in
the thyroïd gland after ¹³¹I administration.
Acta Endocr. 1958, 28, 262-272.
- 3 - BORNET H.
Etude des extraits salins de glandes thyroïdes bovines et humaines par filtration sur gel.
Thèse Doctorat d'Etat en Pharmacie Lyon 1969.
- 4 - DIMITRIADOU A., RUSSEL FRASER T., SLATER J.D.H., WAGNER H.
Iodine transfer within the thyroïd in non toxic goîter
Advances in thyroïd research. Pergamon Press Oxford 1961, 313-317.
- 5 - ERMANS A.M., BASTENIE P.A., GALPERIN H., BECKERS C., VAN DEN SCHRIECK H.G., DE VISSCHER M.
Endemic goîter in the Uele region. II Synthesis and secretion of thyroïd hormones.
J. Clin. Endocr. 1961, 21, 996-1006
- 6 - ERMANS A.M., DECOSTRE P., KINTHAERT J., COLLARD J.
Kinetics of the synthesis of thyroïd hormones in normal man and in simple goîter.
Current topics in thyroïd research. Proceedings of the 5th international thyroïd conference 1965, 832-837. Acad. Press New-York.
- 7 - ERMANS A.M., DUMONT J.E., BASTENIE P.A.
Thyroïd function in a goîter endemic : I. Impairment of hormone synthesis and secretion in the goîtrous gland.
J. Clin. Endocr. 1963, 23, 539-549.
- 8 - ERMANS A.M., KINTHAERT J., CALAY R., GOOSSENS F., BASTENIE P.A.
Etude sur le métabolisme de l'iode intrathyroïdien et sur la nature de l'hormone circulante dans le goître simple.
La thyroïde. Etude clinique et physiopathologique.
Problèmes actuels d'endocrinologie et de nutrition. Série n° 8, 1964, 233-250. L'expansion Ed.

- 9 - ERMANS A.M., KINTHAERT J., CAMUS M.
Defective intrathyroidal iodine metabolism in non toxic goiter :
inadequate iodination of thyroglobulin.
J. Clin. Endocr. 1968, 28, 1307-1316.
- 10 - ERMANS A.M., KINTHAERT J., DELCROIX C., COLLARD J.
Metabolism of intrathyroidal iodine in normal men.
J. Clin. Endocr. 1968, 28, 169-180.
- 11 - ETLING N.
Etude biochimique de la glande thyroïde humaine normale. 24 Heu-
res après administration d'iode radioactif.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1965, 10, 1076-1079.
- 12 - ETLING N.
Etude de l'iode stable des protéines insolubles de tissus thy-
roïdiens humains (normal et pathologique).
Réunion de l'Association Européenne de recherches sur la glande
thyroïde, Marseille 1968.
- 13 - ETLING N.
Etude de tissus thyroïdiens provenant d'hyperthyroïdiens traités
par le Lugol.
Journées Endocrinologiques de la Pitié. Juin 1970, 31-39.
- 14 - ETLING N., BOUHNİK J.
Etude des iodoaminoacides marqués de thyroïdes pathologiques et
comparaison avec ceux de thyroïdes humaines normales.
Ann. Endocr. 1969, 30, 633-640.
- 15 - ETLING N., MARTIN A., VALLEE G., LACHIVER F.
Iodation de protéines de la thyroïde humaine (normale et patholo-
gique).
Acta Endocr. 1968, 59, 545-554.
- 16 - ETLING N., VALLEE G.
Etude biochimique de la thyroïde humaine normale à l'aide de
l'iode radioactif.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1967, 12, 37-46.
- 17 - JONES J.E., SHULTZ J.S.
Identification of thyroidal iodoaminoacids by gel filtration and
automated ¹²⁷I determination.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 975-985.
- 18 - MICHEL R.
Recent progress in the physiology and biochemistry of thyroid
hormones.
Amer. J. Med. 1956, 20, 670-683.

- 19 - PITT-RIVERS R.
Iodine metabolism in the thyroid gland of the rat
Biochem. J. 1962, 82, 108-112.
- 20 - PITT-RIVERS R., HUBBLE D., HOATHER W.H.
A chromatographic study of thyroidal iodine metabolism in non
toxic nodular goiter.
J. Clin. Endocr. 1957, 17, 1313-1323.
- 21 - PLASKETT L.G., BARNABY C.F., LLOYD G.I.
Intrathyroidal iodine metabolism in the rat. The iodotyrosines
Biochem. J. 1963, 87, 473-480.
- 22 - ROBBINS J.
Thyroglobulin fractionation on diethylaminoethylcellulose columns.
J. Biol. Chem. 1963, 238, 182-188.
- 23 - SALABE G.B., TONELLI S., SALABE H., BASCHIERI L.
Soluble thyroid iodoproteins and iodine kinetics in thyroglobu-
lin of nodular goiter.
Current topics in thyroid research. Proceedings of the 5th inter-
national thyroid conference 1965, 900-909. Acad. Press New-York.
- 24 - SALVATORE G., VECCHIO G., SALVATORE M., CAHNMAN H.J., ROBBINS J.
27 S thyroid iodoprotein. Isolation and properties.
J. Biol. Chem. 1965, 240, 2935- 2943.
- 25 - THOMAS C., NATAF B., TUBIANA M.
Etude de l'hormonogenèse thyroïdienne chez l'homme par la métho-
de de double marquage.
Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1966, 11, 1030-1036.
- 26 - VERNAY M.J.
Etude des protéines extraites de tissus thyroïdiens normaux et
pathologiques marquées à l'iode 131.
Thèse de Doctorat d'Université en Pharmacie Lyon 1968.
- 27 - WAHNER H.W., GAITAN E., CORREA P.
Studies of iodine metabolism in endemic nodular goiter.
J. Clin. Endocr. 1966, 26, 279-286.

C O N C L U S I O N S

Ce travail a pour but d'étudier la répartition quantitative de l'iode dans les composés iodés intrathyroïdiens. L'étude a porté sur 15 adénomes toxiques autonomes et sur 9 des tissus périnodulaires. Nous avons également effectué l'analyse de 5 glandes thyroïdes normales, prélevées sur des cadavres.

1. TECHNIQUE.

Notre technique d'étude comprend trois étapes :

1°) L'extraction des protéines thyroïdiennes et des molécules iodées libres par une solution saline tris-NaCl 0,14 M, pH 7, à 4° C. pendant 24 heures.

2°) L'hydrolyse enzymatique des protéines de l'extrait thyroïdien par la viokase à 37° C. pendant 20 heures, à pH 8,5, selon une technique dérivée de celle de Tong et Chaikoff.

3°) La séparation des composés iodés par chromatographie sur colonne de séphadex G₂₅ "fine". On obtient les diagrammes d'élution suivants (par ordre d'élution des composés) :

- Pour les extraits :

protéines iodées, iode minéral, éventuellement MIT, DIT, T₃ et T₄ libres.

- Pour les hydrolysats :

polypeptides non hydrolysés, iodure avec de part et d'autre deux pics de moindre importance dont la nature ne nous est pas connue, MIT, DIT, iodothyronines.

Cette méthode de séparation par chromatographie sur colonne de séphadex G₂₅ a été choisie pour deux raisons principales : c'est une technique simple et reproductible, et elle permet un dosage automatique de l'iode 127 des molécules organiques après minéralisation. Elle présente cependant l'inconvénient de ne pas séparer la triiodothyronine de la thyroxine. Par contre, elle sépare bien les autres composés iodés, en particulier MIT et DIT.

Dans un premier temps, nous avons testé cette technique de séparation avec des solutions d'iodure et d'acides aminés pures pour nous assurer de sa validité, de sa reproductibilité, ainsi que de la valeur des dosages de l'iode 127 effectués dans les éluats. Les résultats satisfaisants nous ont autorisé à entreprendre l'étude des composés iodés des tissus thyroïdiens d'adénomes toxiques et de leurs tissus périnodulaires.

Le marquage préalable in vivo de ces tissus par deux isotopes radioactifs de l'iode (iode 131 et iode 125), ingérés à des temps différents avant l'intervention, nous a permis de suivre la cinétique de la biosynthèse des composés iodés intrathyroïdiens.

2. RESULTATS.

- 1°) Les trois types de tissus renferment les mêmes composés iodés.
- 2°) Les concentrations en iode stable extractible de l'adénome ($m = 153,2 \mu\text{g/g}$ de tissu) sont nettement inférieures à celles des tissus normaux ($m = 510 \mu\text{g/g}$) mais plus élevées que celles des tissus périnodulaires ($m = 80,8 \mu\text{g/g}$).
- 3°) Il n'existe pas de différence significative entre les pourcentages d'extraction des composés iodés pour les trois tissus, quel que soit l'isotope de l'iode considéré.
- 4°) La distribution de l'iode stable dans les extraits montre une masse d'iodure stable libre nettement plus élevée dans l'adénome ($m = 51,6 \mu\text{g/g}$ de tissu frais) que dans les autres tissus ($m = 3,9 \mu\text{g/g}$ dans le tissu normal, $m = 3,6 \mu\text{g/g}$ dans le tissu périnodulaire).
- 5°) L'iode stable thyroglobulinique, calculé en assimilant l'ensemble des protéines iodées à la thyroglobuline, est beaucoup plus faible dans l'adénome ($m = 100,3 \mu\text{g/g}$ de tissu frais) que dans les tissus normaux ($m = 492,8 \mu\text{g/g}$), mais un peu plus élevé que dans les tissus périnodulaires ($m = 75,8 \mu\text{g/g}$).
- 6°) L'augmentation de la fraction iodure stable dans l'adénome a pour corollaire une diminution de la concentration en iode stable organique. En calculant l'iode stable de chacun des acides aminés iodés isolés (MIT, DIT, iodothyronines), on a pu déterminer le nombre moyen de molécules-gramme de chacun d'entre eux par gramme de tissu thyroïdien. Ces résultats montrent une concentration beaucoup plus élevée de MIT, DIT, T_4 dans le tissu thyroïdien normal que dans l'adénome (rapport d'environ 5). Cet écart est encore plus élevé entre le tissu normal et le tissu périnodulaire pour la DIT (rapport de 9) et les iodothyronines (rapport de 12).
- 7°) Les rapports $\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ stables sont fonction décroissante de la concentration en iode 127 des tissus, augmentant lorsque la concentration en iode 127 diminue. Ils sont le reflet du taux d'iodation de la thyroglobuline.
- 8°) La distribution des isotopes radioactifs montre que la répartition de l'iode dans les iodotyrosines se fait très rapidement puisque les rapports $\frac{\text{MIT}}{\text{DIT}}$ restent constants en fonction du temps (variation non significative au seuil 5 %). Ceci est d'ailleurs confirmé par la stabilité des rapports des activités spécifiques de ces molécules, de la 24ème heure au 40ème jour.

9°) Si l'incorporation de l'iode radioactif dans les iodotyrosines atteint un équilibre rapide, les activités spécifiques relatives des iodothyronines (A.S. Iodothyronines ou A.S. Iodothyronines)

A.S. MIT A.S. DIT

montrent qu'il n'en est pas de même pour ces molécules, qui se synthétisent beaucoup plus lentement. Nos résultats et la comparaison de nos courbes avec celles d'autres auteurs semblent cependant montrer que cette incorporation est plus rapide dans l'adénome que dans les tissus normaux et les goîtres simples.

10°) L'activité spécifique des iodures diminue du 1er au 40ème jour.

L'anomalie métabolique la plus constante et la plus remarquable observée est la présence d'une concentration en iode minéral 127 particulièrement élevée dans l'adénome thyroïdien toxique. Cette anomalie, jointe aux autres observations métaboliques, peut-être interprétée par l'existence d'un compartiment d'iodure minéral, de masse importante, de faible taux de renouvellement, participant peu au cycle de l'iode intrathyroïdien, alimenté par la déshalogénation enzymatique des composés iodés thyroïdiens après hydrolyse de la thyroglobuline.

Vu, le Directeur de l'U.E.R. de
Biologie Humaine.

J.C. CZYBA.

Le Président de la Thèse :

M. BERGER

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 22 Mars 1972

Le Président de l'Université:

J. BOIDIN

TABLE DES MATIERES

	Pages
- INTRODUCTION	1
- BIBLIOGRAPHIE	5
- <u>PREMIERE PARTIE : METHODES DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES IODES DANS LES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES</u>	7
- <u>Chapitre I : Méthodes de séparation des acides aminés iodés</u>	9
1. Electrophorèse de zone	9
2. Chromatographie sur papier	10
3. Chromatographie en couche mince	10
4. Chromatographie sur colonne	11
4 - 1. Résines échangeuses d'ions	11
4 - 2. Gel de dextrane	12
5. Chromatographie en phase gazeuse	12
Bibliographie	15
- <u>Chapitre II : Méthodes d'identification et de dosage des acides aminés iodés.</u>	21
1. Méthode d'estimation qualitative et semi-quantitative des acides aminés iodés	21
1 - 1. Réactifs de l'iode et des acides aminés iodés	21
1 - 2. Mesure de la radioactivité après marquage	22
2. Dosage chimique. Minéralisation suivie du dosage de l'iode par son action catalytique sur la réduction de l'ion cérique	22
3. Dosage par activation neutronique	23
4. Mesure de la radioactivité	23
Bibliographie	25
- <u>Chapitre III: Du tissu à l'hydrolysate thyroïdien</u>	27
1. Extraction par les solutions salines	27
2. Hydrolyse de l'extrait	27
2 - 1. Hydrolyse acide ou alcaline	28
2 - 2. Hydrolyse enzymatique	29
Bibliographie	31

- <u>DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS</u>	35
- <u>Chapitre I : Description des techniques utilisées</u>	37
1. Préparation de l'extrait glandulaire	37
2. Hydrolyse de l'extrait	37
3. Séparation des composés iodés de l'extrait	38
3 - 1. Par chromatographie sur gel de séphadex G ₂₅	38
3 - 2. Par chromatographie sur papier	40
4. Détection et dosage de l'iode stable	41
4 - 1. Détection	41
4 - 2. Dosage	41
5. Dosage de l'iode radioactif	46
5 - 1. Chromatogrammes sur papier	46
5 - 2. Eluat	47
Bibliographie	51
- <u>Chapitre II : Essais et contrôle des techniques utilisées</u>	53
1. Préparation et contrôle des solutions iodées	53
2. Récupération des composés iodés introduits séparément sur colonne de séphadex G ₂₅	55
2 - 1. Contrôle par dosage de l'iode stable	55
2 - 2. Contrôle par mesure de la radioactivité	57
3. Récupération des mélanges de composés iodés introduits sur colonne de Séphadex G ₂₅	58
4. Séparation des composés iodés de l'extrait brut sur Séphadex G ₂₅	60
5. Séparation des composés iodés de l'extrait hydrolysé	62
5 - 1. Pic de polypeptides (PP)	62
5 - 2. Le problème des trois pics de la région des iodures	62
5 - 3. Les pics d'iodotyrosines et les difficultés de séparation	64
Bibliographie	69
- <u>Chapitre III : Etude des glandes thyroïdes normales</u>	71
1. Résultats	71
1 - 1. Concentration en iode 127 des tissus	71
1 - 2. Pourcentage d'extraction de l'iode 127	72
1 - 3. Distribution de l'iode stable dans les extraits	73
1 - 4. Distribution de l'iode stable dans les hydrolysats des extraits	75
2. Discussion	76
Bibliographie	79

- <u>Chapitre IV : Etude des adénomes toxiques</u>	81
1. Résultats	83
1 - 1. Concentration en iode 127 des tissus	83
1 - 2. Pourcentage d'extraction de l'iode	84
1 - 3. Quantité d'iode radioactif fixé par gramme de tissu thyroïdien frais exprimée en pourcentage de la dose ingérée	85
1 - 4. Distribution de l'iode dans les extraits	88
1 - 5. Distribution de l'iode dans les hydrolysats	95
1 - 5 - 1. Fraction non hydrolysée	95
1 - 5 - 2. Fraction iodure	100
1 - 5 - 3. Fractions iodotyrosines et iodothyronines	101
1 - 6. Etude des activités spécifiques des composés iodés	110
1 - 6 - 1. Protéines et iodure des extraits	110
1 - 6 - 2. Iodotyrosines et iodothyronines des hydrolysats	111
- <u>Chapitre V : Etude des tissus périnodulaires</u>	115
1. Résultats	115
1 - 1. Concentration en iode 127	115
1 - 2. Pourcentage d'extraction de l'iode	117
1 - 3. Quantité d'iode radioactif fixé par gramme de tissu thyroïdien frais exprimé en pourcentage de la dose ingérée	118
1 - 4. Distribution de l'iode dans les extraits	119
1 - 5. Distribution de l'iode dans les hydrolysats d'extraits	121
1 - 5 - 1. Fraction non hydrolysée	123
1 - 5 - 2. Fraction iodure	123
1 - 5 - 3. Fractions iodotyrosines et iodothyronines	124
1 - 6. Etude des activités spécifiques des composés iodés	129
1 - 6 - 1. Protéines et iodure des extraits	129
1 - 6 - 2. Iodotyrosines et iodothyronines des hydrolysats	129
- <u>Chapitre VI : Discussion</u>	131
1. Concentration en iode 127 des tissus	131
2. Pourcentage d'extraction de l'iode	132
3. Quantité d'iode radioactif fixé par gramme de tissu thyroïdien frais	134
4. Distribution de l'iode dans les extraits	135
5. Distribution de l'iode dans les hydrolysats	137
5 - 1. Fraction non hydrolysée	137
5 - 2. Fraction iodure	138
5 - 3. Fractions iodotyrosines et iodothyronines	140
Bibliographie	147
- CONCLUSIONS	151

